

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMUNOMODULAÇÃO POR LEVAMISOL NA IMUNIDADE  
INATA E ADQUIRIDA DE PACU (*Piaractus  
mesopotamicus*)**

**Jaqueline Dalbello Biller Takahashi**

**Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias – UNESP - Câmpus de Jaboticabal, como  
parte das exigências para a obtenção do título de  
Doutor em Zootecnia.

Jaboticabal – SP  
Dezembro de 2010

B597i Biller-Takahashi, Jaqueline Dalbello  
Imunomodulação por levamisol na imunidade inata e adquirida de  
pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Jaqueline Dalbello Biller Takahashi.  
— — Jaboticabal, 2011  
x, 131 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: José Eurico Possebon Cyrino, Helio José  
Montassier, Janessa Sampaio de Abreu, Fabiana Pilarski  
Bibliografia

1. Peixes\_imunologia. 2. Peixes\_imunomodulação. 3.  
Peixes\_imunização. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**JAQUELINE DALBELLO BILLER TAKAHASHI** - nascida em Novo Horizonte, no dia 27 de setembro de 1981, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal em 2001. Durante sua graduação realizou diversos cursos na área de produção animal, participou de vários congressos e executou uma iniciação científica intitulada “Efeito da Exposição Aérea repetida nas Respostas de Estresse em Pacus, *Piaractus mesopotamicus*” e um trabalho de graduação intitulado “Efeito da administração oral de cortisol em pacu *Piaractus mesopotamicus* frente ao desafio com *Dolops carvalhoi*.” Ambos realizados no laboratório de Morfologia e Fisiologia Animal sob orientação da Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati. Concluiu o curso de graduação em dezembro de 2005. Em Março de 2006 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Campus de Jaboticabal, em fevereiro de 2008 finalizou suas atividades com a aprovação da sua Dissertação de Mestrado pela banca examinadora, iniciando o curso de Doutorado em Zootecnia em março de 2008, na mesma instituição, sendo que em dezembro de 2010 submeteu sua Tese de Doutorado à banca examinadora.

“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

## **DEDICATÓRIA**

A minha família, Roberto, Sueli, Karine, Ricardo, Guilherme e Felipe, que sempre me incentivaram e deram forças para continuar. Pelo grande exemplo de dedicação, seriedade, força, humildade e educação.

Ao meu esposo Leonardo que sempre esteve ao meu lado completando minha vida com alegria e ternura.

Simplesmente as pessoas mais importantes da minha vida e responsáveis por todas as minhas conquistas e vitórias.

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati pela orientação, pelas mais importantes oportunidades, paciência e carinho oferecidos.

Ao Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino pelas brilhantes correções, considerações e incentivos realizados durante a defesa e nos demais encontros.

Ao Prof. Dr. Helio José Montassier pelas idéias e sabedoria na correção deste trabalho, bem como durante todo período de desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Janessa Sampaio de Abreu pela pelas valiosas sugestões ao trabalho e principalmente pelo incentivo desde o mestrado.

A Profa. Dra. Fabiana Pilarski e ao Laboratório de Patologia de Peixes pela constante colaboração nas intermináveis análises durante todo este período de estudo, do fornecimento de bactérias utilizadas neste experimento, além da alegria compartilhada nos diversos momentos

A Profa. Dra. Luciane Helena G. Batalhão pela constante atenção e amizade e pela gentil e brilhante contribuição para a consolidação da tese.

A Profa. Dra. Teresa Cristina Ribeiro Dias por contribuir de forma admirável para a materialização da tese.

Ao Prof. Dr. Luis Roberto Furlan pelas excepcionais avaliações para a solidificação da tese.

Ao Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi pelas incansáveis colaborações desde o início do estudo, durante as etapas de programação e execução, bem como, o carinho e tranquilidade nos momentos difíceis.

A Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado pelo auxílio nas análises imunológicas, correções, incentivos e pela sua amizade.

Aos professores do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, bem como seus funcionários: Damares, Isabel, Euclides, Clara e Wagner e aos funcionários do Centro de Aqüicultura da Unesp pela ajuda e amizade durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Roque Takahashi e a Profa. Madalena Takahashi pelas incontáveis horas de apoio e compreensão, sem as quais a execução deste trabalho estaria prejudicada.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia Animal: Fabio Zanuzzo, Rafael Sabioni, Marcos Saita, Rodrigo Gimbo, Rosangela, Rulliam, Ana Paula, Mariana, Mônica, Carla, Sergio Zaiden, Marcio, Luis Henriques, pelas longas horas de experimento e análises e pelo apoio e amizade, e aos amigos do Caunesp: Fabiana Pilarsky, Fernanda Sebastião, Roberson, Edsandra, Lidiane, Juliana, Vera e aos estagiários da fisiologia e do Caunesp pela contribuição durante as coletas e análises.

Aos professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Zootecnia e do Centro de Aqüicultura da UNESP pelos ensinamentos, pela amizade e pela colaboração nesta jornada.

Aos amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta etapa. Mas que apenas no momento de escrever acabaram passando, sintam-se eternamente agradecidos por terem contribuído na realização dos trabalhos ou na convivência, e que eu possa retribuir de alguma forma.

A CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e auxílios na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                   | Página    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1 – Imunologia e imunomodulação em peixes.....</b>                                                                                    | <b>01</b> |
| 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....                                                                                                                    | 01        |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA.....                                                                                                                     | 02        |
| 2.1. Sistema Imune dos Peixes.....                                                                                                                | 02        |
| 2.2. Sistema Complemento.....                                                                                                                     | 14        |
| 2.3. Inflamação.....                                                                                                                              | 15        |
| 2.4. Complexo principal de histocompatibilidade (MHC).....                                                                                        | 16        |
| 2.5. Linfócitos: subpopulações e funções.....                                                                                                     | 17        |
| 2.6. Anticorpos.....                                                                                                                              | 20        |
| 2.7. Imunização.....                                                                                                                              | 22        |
| 2.8. Imunoestimulantes e imunomodulação em peixes.....                                                                                            | 23        |
| 2.9. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....                                                                                                            | 25        |
| 3. MODELO BIOLÓGICO.....                                                                                                                          | 26        |
| 4. OBJETIVOS GERAIS.....                                                                                                                          | 26        |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                                | 27        |
| <b>CAPÍTULO 2 – Respostas imunes inatas e hematologia de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> após alimentação suplementada com levamisol.....</b> | <b>43</b> |
| RESUMO.....                                                                                                                                       | 43        |
| INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                   | 44        |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                           | 47        |
| RESULTADOS.....                                                                                                                                   | 52        |
| DISCUSSÃO.....                                                                                                                                    | 64        |
| CONCLUSÕES.....                                                                                                                                   | 69        |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                                   | 69        |
| <b>CAPÍTULO 3 – Imunização de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> após sete dias de administração de levamisol.....</b>                           | <b>75</b> |
| RESUMO.....                                                                                                                                       | 75        |
| INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                   | 76        |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                           | 78        |
| RESULTADOS.....                                                                                                                                   | 87        |
| DISCUSSÃO.....                                                                                                                                    | 109       |
| CONCLUSÕES.....                                                                                                                                   | 114       |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                                                   | 114       |



## IMUNOMODULAÇÃO POR LEVAMISOL NA IMUNIDADE INATA E ADQUIRIDA DE PACU *Piaractus mesopotamicus*

**RESUMO** – O aparecimento de doenças em peixes de criação intensiva é um problema enfrentado no Brasil e no mundo. Algumas substâncias podem influenciar as respostas do sistema imune de peixes, como o levamisol, através da modulação de parâmetros imunes, aumentando a resistência contra diversos agentes. Foram avaliados os efeitos do levamisol na dieta em dois experimentos. O primeiro experimento avaliou a suplementação com 0, 125, 250 e 500 mg kg<sup>-1</sup> do imunoestimulante administrado por sete e 15 dias, no qual foram avaliados os parâmetros da imunidade inata, hematológicos e bioquímicos. A administração do levamisol por sete e 15 dias promoveu alterações em parâmetros imunológicos e hematológicos. A administração do levamisol pode promover imunomodulação, entretanto a determinação do efeito não ficou claro devido às respostas contraditórias em cada parâmetro avaliado. O segundo experimento consistiu em suplementação com 0, 125, 250 e 500 mg kg<sup>-1</sup> do imunoestimulante administrada por sete dias conjuntamente com a imunização com bactérias *Aeromonas hydrophila*. A imunização e a administração de levamisol promoveram aumento do título de anticorpos, atividade bactericida do soro, hematócrito, número de eritrócitos, leucócitos totais e trombócitos nos pacus. A administração de levamisol por sete dias e a imunização de pacus promoveu melhora de alguns parâmetros da imunidade adquirida e inata de defesa. Entretanto outros protocolos devem ser estudados para avaliar o efeito do levamisol sobre o sistema imune de pacu.

**Palavras chaves:** Imunologia de peixes, imunomodulação em peixes, imunização em peixes.

## **IMMUNEMODULATION BY LEVAMISOL ON INNATE AND ADQUIRE IMMUNITY OF PACU *Piaractus mesopotamicus***

**SUMMARY** – The emergence of diseases in fish farming is a problem faced in Brazil and worldwide. Some substances can influence the immune system responses of fish, like levamisole, increasing resistance against various etiological agents. Were evaluated the effects of levamisole in diet in two experiments. The first experiment evaluated supplementation with 0, 125, 250 and 500 mg kg<sup>-1</sup> imunoestimulante administered by seven and 15 days in which have been assessed the parameters of innate immunity, haematological and biochemists. The administration of levamisole by seven and 15 days promoted changes in haematological and immunological parameters. The administration of levamisole can promote immunodulation, however the determination of the effect not clear due to contradictory answers evaluated in each parameter. The second experiment consisted of supplementation with 0, 125, 250 and 500 mg kg<sup>-1</sup> imunoestimulante administered by seven days together with immunization with inactivated *Aeromonas hydrophila* bacteria with formaldehyde. Immunization and administration of levamisole promoted increase antibody titre, serum bactericidal activity, hematocrit, number of erythrocytes, leucocytes and thrombocytes in pacus totals. Administration of levamisole for seven days and immunization pacus promoted improves some parameters of innate and acquired immunity defense. However other protocols must be studied to assess the effect of levamisole on the immune system of pacu.

**Keywords:** Fish, immunology, immunemodulation, immunization.

## CAPÍTULO 1 - Imunologia e imunomodulação em peixes

### 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A aquicultura no Brasil vem crescendo, desde a década de 80, em números expressivos, e muitas espécies com características zootécnicas importantes despertam interesse para a produção. Porém, essa intensificação levou ao aparecimento de diversas enfermidades. O uso de quimioterápicos e antimicrobianos é muito criticado por seu impacto negativo no ambiente e nos peixes, como acúmulo de resíduos, desenvolvimento de resistência bacteriana, imunossupressão, e prejuízos na comercialização (Anderson, 1992), fato que estimulou, durante a última década, o uso de imunoestimulantes na prevenção de doenças. Assim, muitos estudos têm sido realizados a fim de viabilizar sua utilização. Para tal, são avaliados principalmente os imunoestimulantes que melhoram o mecanismo de defesa não específico, ativando assim, a proteção precoce contra infecções (Sakai, 1999; Sahoo e Mukherjee, 2001; Selvaraj et al., 2005).

O levamisol, anti helmíntico sintético para mamíferos (JECFA, 1991), conhecido por suas características imunoestimulantes (Renoux, 1980), tem mostrado capacidade de melhorar o sistema imune de peixes e aumentar a resistência contra diversos agentes etiológicos, tais como *Vibrio anguillarum* (Kajita et al., 1990), *Aeromonas hydrophila* (Baba et al., 1993), *Paramoeba* sp. (Findlay et al., 2000; Munday e Zilberg, 2003), *Edwardsiella tarda* (Sahoo e Mukherjee, 2002), *Photobacterium damsela* (Leano et al., 2003), além de nematóides como *Anguillicola crassus* (Geets et al., 1992).

A *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria gram negativa amplamente distribuída nos ambientes aquáticos (Massa et al., 2001; Gonzalez et al., 2002), que pode infectar peixes, anfíbios, répteis e mamíferos, e também o homem (Janda e Abbott, 1998; Vivas et al., 2004). As doenças causadas pela *A. hydrophila* têm grande impacto na aquicultura (Austin e Austin, 1999) e têm sido controladas com tratamentos profiláticos,

como o uso de imunostimulantes e imunizações, ou por medidas curativas, como o uso de antibióticos (Vivas et al., 2004).

Assim, uma alternativa viável para evitar as perdas econômicas provocadas por *Aeromonas hydrophila* e outras enfermidades é o uso de imunostimulantes. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos deste imunostimulante administrado por via oral, nas respostas imunes inatas e adquiridas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), uma espécie comercialmente importante no Brasil, sobre a qual pouco se sabe em relação as respostas imunes.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. SISTEMA IMUNE DOS PEIXES**

#### **2.1.1. Sistema Imune inato e específico de peixes teleósteos**

O sistema imune é primordialmente um conjunto de componentes celulares e humorais que atuam na defesa do organismo contra substâncias estranhas, tais como microrganismos, toxinas ou células malignas, respondendo frente a quaisquer fatores, tanto exógenos como endógenos, que estimulem os componentes deste sistema (Bayne, 2001).

Os peixes são suscetíveis a agentes infecciosos virais, bacterianos, fúngicos e parasitários, e quando ocorre uma infecção/infestação há duas possibilidades. O resultado depende primordialmente de uma ação inicial eficiente do sistema imune. Assim, se o organismo possui mecanismos para evitar a entrada e instalação dos microrganismos há grande possibilidade de sobrevivência (Ellis, 2001).

O sistema imune dos peixes é dividido em inato ou não específico e específico ou adaptativo (de memória), ambos divididos em defesa mediada por células e fatores humorais (substâncias solúveis), mas hoje se sabe que os dois sistemas atuam conjuntamente para destruir invasores ou desencadear processos de defesa. O sistema

inato inclui todos os componentes presentes no organismo antes do aparecimento do invasor, formando a primeira barreira de defesa orgânica, atua mais rapidamente em relação ao específico e continua atuando para manter o equilíbrio orgânico. Dentre estes componentes estão a pele como barreira física, o sistema complemento, o sistema de enzimas antimicrobianas e os mediadores não específicos tais como o interferon, as interleucinas e as células de defesa orgânica, como os granulócitos, monócitos, macrófagos e células natural killer (NK) (Ellis, 1999).

O sistema inato é o mais antigo na escala filogenética e surgiu nos organismos unicelulares durante o período evolutivo. Por definição, este sistema reconhece regiões de moléculas (Pamps – Pathogen associated molecular patterns) provenientes de agentes infecciosos ou microrganismos da microbiota normal, tais como lipopolissacarídeos, peptidioglicanos, DNA bacteriano ou RNA viral, ou ainda outras moléculas encontradas nas membranas de microrganismos multicelulares (“non-self”) (Janeway 1989; Elward e Gasque, 2003), nunca reconhecendo componentes do próprio organismo, pois os genes que codificam estes receptores (PRRs – Pattern recognition receptors) estão presentes no genoma do organismo. Os Pamps são normalmente porções altamente conservadas durante a evolução das espécies e estão presente na grande maioria dos microrganismos (Goldsby et al., 2002).

Por outro lado, o sistema específico surgiu bem depois, em torno de 450 milhões de anos, e pode ser encontrado em todos os vertebrados, exceto nos peixes da Classe Agnatha (Holland e Lambris, 2002). Os receptores do sistema adquirido, responsáveis por detectar o agente invasor, se encontram na membrana de células imunocompetentes, os linfócitos T (TCR) e os linfócitos B (BCR, imunoglobulina de superfície), diferindo do sistema inato (Abbas e Litchman, 2004).

A primeira barreira de defesa do organismo é o tegumento, constituído por muco e pele, sendo uma barreira epitelial com células especializadas, secretoras de componentes bactericidas que atuam para evitar a entrada de microrganismos nocivos. Entretanto, se os microrganismos forem capazes de romper esta barreira e penetrar nos tecidos e circulação, estes serão reconhecidos por diversos componentes do organismo

hospedeiro, tais como os fagócitos e os linfócitos Natural Killer (NK), além de proteínas plasmáticas, entre elas as proteínas do sistema complemento e a lisozima (Ellis, 1999).

A inflamação também é considerada um mecanismo inato de resposta imune, mediada por complexas interações de compostos celulares e humorais. Assim, após a invasão tecidual de um agente infeccioso, há liberação de mediadores que irão dilatar e tornar mais permeável os capilares sanguíneos, permitindo a migração das células de defesa. Os granulócitos são as células que chegam inicialmente ao foco da inflamação, sendo os responsáveis pela destruição dos patógenos. Já os debris celulares e células patogênicas restantes são fagocitadas por macrófagos que substituem os granulócitos num momento mais tardio (Magnadottir, 2006).

O sistema específico de defesa necessita da presença do antígeno para desencadear cascatas de reações que culminarão no aumento de anticorpos circulantes específicos para tais invasores, além de promover memória imune (Bernstein et al., 1998). Estas porções que podem ser reconhecidas são chamadas de antígenos. Alguns antígenos promovem maior resposta imune que outros e são conhecidos como mais imunogênicos (Delves e Roitt, 2000 a,b).

Os antígenos que penetram no organismo são reconhecidos e processados pelo sistema inato e são capturados pelas células apresentadoras de antígenos (CAA - macrófagos, células dendríticas e linfócitos B), que processam microrganismos em unidades moleculares, e num primeiro momento desencadeiam resposta imune e de proliferação, e num segundo momento, resposta de memória (Abbas e Lichman, 2004). Assim, o antígeno que promove a memória imune será apresentado através das CAA para o linfócito T. Os linfócitos T são células do sistema específico que apresentam capacidade de reconhecer o antígeno restritamente na presença de componentes humorais específicos chamados de moléculas de histocompatibilidade, que são receptores glicoprotéicos codificados por genes em um complexo gênico denominado complexo de histocompatibilidade maior (MHC). Após este reconhecimento, a célula T secreta citocinas, que são proteínas que ativam outras células, tais como linfócitos B (responsáveis pela produção de anticorpos), linfócitos citotóxicos, macrófagos e outras células que irão atuar para destruição do agente invasor (Goldsby et al., 2002).

Os anticorpos ligam-se aos microrganismos e conseqüentemente ativam a fagocitose (componente do sistema inato, indicando que os dois sistemas, inato e específico, atuam conjuntamente), promovem neutralização e opsonização do agente, bem como ativação do complemento e citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (Ellis, 2001). Os anticorpos apresentam capacidade de se ligar a antígenos extracelulares, nas mucosas ou na corrente sanguínea. Quando estes se alojam no compartimento intracelular, a defesa é realizada por linfócitos T citotóxicos (Goldsby et al., 2002).

Parasitos, vírus, bactérias e fungos iniciam interações contra os organismos vertebrados aquáticos e causam doenças, resultando em sobrevivência ou morte do animal. Este resultado depende diretamente da resposta dos sistemas imunes inato e específico (Balfry e Higgs, 2001). Frente à ameaça real de um invasor, fatores celulares e humorais dos sistemas específico e não específico atuam externa e internamente, em conjunto ou isoladamente, contra estes agentes, na tentativa de preservar a vida (Iwana e Nakanishi, 1996).

### **2.1.2. Tecidos e órgãos do sistema imune**

Os tecidos e órgãos que compõem o sistema imune de peixes teleósteos são classificados como linfóides, e não há órgãos ou tecido classificados como mielóides, como em mamíferos, pois os peixes não possuem medula óssea ou linfonodos. Os órgãos linfóides são os rins (maior órgão linfóide), timo, baço e tecidos linfóides associados à mucosa, formados durante o desenvolvimento larval. Sabe-se que há aproximadamente 24.000 espécies de peixes, e diferenças morfológicas espécie-específica são encontradas (Nelson, 1994; Press e Evensen, 1999).

Os tecidos e órgãos linfóides responsáveis pela produção dos componentes do sistema imune geralmente são compostos por redes de células reticulares que representam a estrutura para as células de defesa inata e específica, tais como linfócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos e trombócitos (Ellis, 1977), mastócitos,

células NK, células citotóxicas e células dendríticas (Avilés-Trigueros e Quesada, 1995; Evans e Jaso-Friedmann, 1992; Miller et al., 1985; Reite, 1997) e melanomacrófagos, localizadas principalmente nos tecidos hematopoiéticos do rim, baço, no fígado e na região da veia periportal (Roberts, 1975; Wolke, 1992; Press e Evensen, 1994).

O timo é um órgão duplo localizado na região dorsolateral das brânquias, atrás do opérculo. O surgimento e a histologia do timo variam de acordo com a espécie, entretanto aparece a partir de 24 horas pós-fertilização (Fishelson, 1995). É considerado um importante local de desenvolvimento e maturação de linfócitos T (Bowden, 2005). Embora a involução do timo ocorra em vertebrados adultos, em peixes teleósteos pode variar dependendo da espécie (Torroba e Zapata, 2003).

O rim é um órgão par, muito importante para a hematopoiese - podendo até ser comparado com a medula óssea dos mamíferos - e para a imunidade dos peixes. Apresenta a função de formação e maturação de células sanguíneas e de defesa (Meseguer et al., 1994). A diferenciação de células sanguíneas ocorre no rim já no desenvolvimento inicial. No peixe adulto, o rim apresenta diferenças entre a porção anterior e posterior, ambas com função hematopoiética. Entretanto, a primeira porção do órgão é mais importante para a produção e diferenciação de células do sistema de defesa, tais como a diferenciação e maturação de leucócitos, incluindo linfócitos B, monócitos, macrófagos e granulócitos (Torroba e Zapata, 2003).

A corrente sanguínea atinge o rim pelo sistema porta renal com fluxo lento, o que facilita a exposição do antígeno ao tecido renal. Na porção anterior, há grande concentração de células de defesa - agregados de melanomacrófagos - que possuem função semelhante aos centros germinativos do baço e linfonodos em mamíferos. Nos centros melanomacrófagos, há agregados de células reticulares, macrófagos e linfócitos, que estão relacionados à captura de antígeno e à memória imune. Estas características permitem que o antígeno permaneça por mais tempo nos centros melanomacrófagos do rim, sendo este o maior centro produtor de anticorpos (Brattgjerd e Evensen, 1996).

O baço dos peixes está dividido em polpa branca, envolvida na formação de células de defesa – hematopoiese, e polpa vermelha, envolvida na fagocitose de células



velhas ou defeituosas – hemocaterese. Entretanto, diferente do que ocorre em mamíferos, esta divisão nos peixes não está organizada, embora seja possível a identificação das polpas em diversas espécies. Este órgão possui linfócitos e macrófagos, sendo que a maioria dos macrófagos está arranjada nos centros melanomacrófagos, responsáveis pela hemocaterese. Estes centros melanomacrófagos estão relacionados com memória imune e estimulação antigênica (Press e Evensen, 1994), uma vez que, após a filtração do sangue, os antígenos permanecem retidos nestes centros permitindo seu processamento e consequente apresentação para linfócitos T (Solem, 2006).

Os tecidos linfóides associados à mucosa incluem a mucosa do trato gastrointestinal e brânquias, e a pele. Estes tecidos produzem muco contendo componentes do sistema inato de defesa, tais como lisozima, proteínas do sistema complemento e imunoglobulinas, sendo esta a primeira barreira contra invasores (Dalmo et al., 1997). Estes tecidos linfóides encontram-se de forma desorganizada por toda mucosa, em agrupamentos de leucócitos, entre eles macrófagos, linfócitos, mastócitos e granulócitos (Georgopoulou e Vernier, 1986). Estas células capturam o antígeno e iniciam seu processamento, que pode levar a formação de memória imune (Davidson et al., 1997; Iger e Wendelaar Bonga, 1994; Lin et al., 1998; Lobb, 1987; Moore et al., 1998).

O fígado apresenta a mesma função que em mamíferos, que é produzir as proteínas do sistema complemento e proteínas da fase aguda da resposta inflamatória. Sendo, assim, um órgão muito importante na produção de compostos da defesa humoral inata de peixes (Dalmo, 2005).

### **2.1.3. Imunidade Inata**

#### **2.1.3.1. Imunidade humoral**

O sistema imune dos peixes possui mecanismos responsáveis pela defesa contra microrganismos invasores, apresentando componentes inatos e adquiridos, humorais e mediados por células, que atuam de forma multifatorial na tentativa de evitar a doença (Ellis, 2001). O sistema inato humoral atua por meio de diversos componentes solúveis nos fluidos corpóreos, diferente do sistema específico, que atua apenas por meio de anticorpos (Bayne e Gerwick, 2001).

Os peixes são suscetíveis a agentes virais, bacterianos, fúngicos e parasitários. Entre estes agentes, as bactérias são as grandes causadoras de doenças no mundo todo. Entretanto, os peixes apresentam mecanismos inatos e específicos, humorais e celulares para resistir à invasão bacteriana. Os mecanismos inatos contra a invasão bacteriana incluem a produção de diversos compostos antibacterianos, proteínas de fase aguda da inflamação, ação do complemento ativado pela via alternativa, citocinas, fagocitose e, conseqüentemente, a inflamação (Ellis, 1999; Ellis, 2001).

Entre os componentes humorais inatos, estão os fatores inibidores do crescimento de bactérias, como a transferrina, antiproteases, lisozima, proteína C reativa, peptídeos antibacterianos e as proteínas do sistema complemento, ativadas pela via alternativa e das lectinas, estas as últimas as mais importantes, pois possuem atividade lítica, pró inflamatória, quimiotática e opsonizante, influenciando a ação de células de defesa. Entre as células de defesa, os fagócitos, representados pelos neutrófilos e macrófagos, são muito importantes por possuírem grandes quantidades de enzimas em lisossomos. Além disso, na presença de bactérias, produzem espécies reativas de oxigênio que são responsáveis pela destruição destes microrganismos. O agente etiológico bacteriano necessita ultrapassar estas barreiras para que se instale a infecção (Ellis, 1999).

Os fatores inibidores do crescimento bacteriano são importantes para evitar a disseminação da colônia e consequentes danos teciduais. Entre estes fatores estão a transferrina, proteína solúvel presente no sangue, que além de ser considerada uma proteína ativadora de macrófagos, se apresenta como uma proteína conjugadora de metais, com alta afinidade pelo íon ferro, ocorrendo em grande concentração principalmente na fase aguda da inflamação (Bayne e Gerwick, 2001; Stafford e Neumann, 2001; Stafford e Neumann, 2003). Sua importância está no fato de que o íon ferro é essencial para algumas bactérias e muito importante para o estabelecimento da infecção. Este íon apresenta-se escasso nos tecidos e fluidos corpóreos, exigindo das bactérias mecanismos específicos para obter ferro e efetivar a infecção (Bullen e Griffiths, 1987).

As antiproteases são proteínas presentes no sangue, que atuam sobre proteínas proteolíticas de bactérias que destroem os tecidos dos peixes para obtenção de aminoácidos como fontes de sua nutrição. Desta forma, elas evitam a obtenção de energia para a multiplicação das bactérias. As lectinas são proteínas encontradas em ovos, muco e sangue e apresentam alta afinidade por carboidratos que fazem parte da parede celular das bactérias, promovendo aglutinação dos patógenos (Ohta et al., 1990; Arason, 1996).

As lisinas são peptídeos antibacterianos que atacam membranas dos patógenos (Ellis 1999; Ellis, 2001), por exemplo, as proteases presentes principalmente no muco (Braun et al., 1990). A lisozima, enzima presente no muco, ovos, sangue e tecidos onde existem leucócitos (principalmente monócitos e neutrófilos) (Murray e Fletcher, 1976), atua sobre o peptideoglicano da parede de bactérias gram positivas e negativas (Magnadotir, 2006). A proteína C reativa (pertencente à família das pentraxina) é encontrada em grandes concentrações no sangue, ovo e muco normal de peixes e liga-se a fosforilcolina, componente normalmente encontrado nas paredes de diversos microrganismos, como bactérias, fungos e parasitas (Yano, 1996). A proteína C reativa e a lectina ligadora de manose (Mannosebinding lectin - MBL) são consideradas proteínas de fase aguda e receptores solúveis de componentes microbianos, ligando-se e promovendo sua opsonização (Goldsby et al., 2002) e ativação do complemento e da

fagocitose (Nakanishi et al., 1991). Estas proteínas de fase aguda aumentam sua concentração após choque térmico (altas temperaturas), frente a agentes infecciosos e em períodos quentes do ano (Winkelhake e Chang, 1982; Kodama et al., 1989; Szalai et al., 1994).

O sistema complemento é um conjunto de proteínas solúveis e de membrana divididos em via alternativa, clássica e via das lectina, com ativação muito semelhante aos mamíferos. A via alternativa é independente de anticorpo e considerada a mais importante para peixe devido sua alta eficiência nos mecanismos de defesa inata. Esta via pode ser ativada por lipopolissacarídeos de membranas de diversas bactérias gram negativas e causar citólise. Durante a ativação do complemento, dois componentes, C5a e C3b, são muito importantes para o recrutamento de fagócitos. O C5a é uma proteína quimiotática para neutrófilos e macrófagos, que possuem receptores para C3b, mantendo-se ligada a parede bacteriana, facilitando a fagocitose (Yano, 1996; Ellis, 2001).

Os componentes humorais inatos apresentam concentrações elevadas (em alguns casos a proteína C reativa que pode aumentar em até 1000 vezes) após invasão de agentes patogênicos (bactéria, vírus, parasitos e fungos), traumas, necroses, substâncias químicas irritantes, queimaduras e células tumorais. Estes compostos são chamados de proteínas de fase aguda e a resposta do organismo, de resposta de fase aguda. A grande maioria destas proteínas é sintetizada pelo fígado, entretanto há outros locais de produção, como o cérebro e leucócitos. Muitas vezes são utilizadas como indicadores no diagnóstico de doenças, entre elas, a proteína C reativa, soro amilóide A, transferrina,  $\alpha$ -2 macroglobulina, C3 do complemento, lisozima e lectinas (Bayne e Gerwick, 2001).

#### **2.1.3.2. Imunidade mediada por células**

As células dos peixes teleósteos que apresentam capacidade de defesa são produzidas pelos tecidos linfóides, tais como rim, timo, baço e tecidos associados à

mucosa. Todas as células sanguíneas são provenientes de um precursor chamado de célula pluripotente, que apresenta também capacidade de autorenovação. A produção destas células é conhecida como hematopoiese. É um processo constante que resulta em formação e maturação celular com consequente diferenciação em diversas células, tais como eritrócitos, granulócitos, monócitos, mastócitos, linfócitos e trombócitos, dependendo do estímulo recebido (Metcalf, 1995; Evans, 1997).

A hematopoiese em peixes é diferente de mamíferos, pois os primeiros não apresentam tecido mielóide. Os peixes possuem apenas tecidos linfóides que apresentam células pluripotentes precursoras, tais como os rins, que produzem células B, monócitos, macrófagos e granulócitos; o timo, que produz e matura os linfócitos T; o baço que produz linfócitos e macrófagos; bem como os tecidos linfóides associados à mucosa que produzem macrófagos, linfócitos, mastócitos e granulócitos (Bowden, 2005; Georgopoulou e Vernier, 1986; Torroba e Zapata, 2003).

A hematopoiese sofre regulação por meio de citocinas que atuam nos receptores das células pluripotentes controlando sua sobrevivência, proliferação, diferenciação, maturação e função (Hanington et al., 2009). A produção adequada destas células está relacionada com o funcionamento dos sistemas inatos e específicos, pois são produtoras das células efetoras destes sistemas (Barreda e Belosevic, 2009). A avaliação dos parâmetros hematológicos pode ser um indicador da presença de doenças e do estado físico dos peixes (Stoskopf, 1993).

Entre as células do sistema de defesa de peixes, os trombócitos são células sanguíneas com função de hemostasia, homeostasia e capacidade de fagocitose, uma vez que possuem fosfatase ácida e normalmente são encontrados em focos inflamatórios (Penha et al., 1996; Tavares-Dias et al., 1999). Já os monócitos possuem atividade fagocitária e citotóxica não-específica, são considerados células em trânsito no sangue e durante o processo inflamatório migram para o tecido conjuntivo onde se transformam em macrófagos (Alaye-Rahy, 1993; Cuesta et al., 1999; Mesenguer et al., 1994; Witten et al., 1998).

Os neutrófilos são células polimorfonucleares que podem ser encontradas no sangue, tecidos linfóides e na cavidade peritoneal (Secombes, 1996). Possuem a

capacidade de fagocitar e produzir ânions superóxidos que atuam como bactericida extracelular (Plyzycz et al., 1989).

Os eosinófilos atuam nos processos de inflamação e na defesa celular mediante a degranulação, e se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastro-intestinal, nas brânquias e na corrente sanguínea quando há infestação de parasitos. Já os basófilos são raros na maioria dos peixes (Hine, 1992). As células granulocíticas especiais (CGE) ou leucócitos granulares PAS-positivo (LG-PAS) são células polimorfonucleares, contudo não se sabe sua função exata (Ranzani-Paiva, 1996). Aparecem em maior número em peixes parasitados ou injetados com agentes flogógenos (Martins, 2000). Os fagócitos supra citados (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) exercem importante função na modulação do sistema imune inato pela fagocitose e conseqüente destruição do patógeno (Verlhac e Gabaudan, 1997).

Os linfócitos T e B são as células responsáveis pelo sistema adaptativo, entretanto um tipo de linfócito que não apresenta as características de T ou B constitui uma população distinta de linfócito, as chamadas células exterminadoras naturais ou "*natural killer-NK*". São componentes do sistema inato e têm a capacidade de lisar células alvo (células estranhas ou infectadas por vírus sem que estas expressem algum antígeno ativador da resposta imune específica), além de fornecer citocinas imunoregulatórias (Greenlee et al., 1991; Farag et al., 2002; Raulet, 2004). Estas células provavelmente apresentam uma mesma célula progenitora T, mas aparentemente não passaram pela maturação no timo (Tizard, 2002).

Algumas células são capazes de realizar endocitose de partículas invasoras e destruí-las ou então apresentá-las ao sistema específico. Este processo é chamado de fagocitose, uma forma de endocitose nas quais partículas grandes, tais como microrganismos, células inteiras, debris celulares e agregados de macromoléculas, são englobadas e processadas em vesículas chamadas de fagossomos. A fagocitose é iniciada pela ligação entre o agente e a membrana do fagócito e é muito importante para defesa contra microrganismos invasores (Neumann et al., 2001).

Os monócitos, macrófagos, granulócitos e células dendríticas são fagócitos profissionais, entretanto outras células podem realizar fagocitose. Para tal, é necessário o reconhecimento do agente invasor por meio de receptores de membrana. Nos locais de entrada dos agentes, sinais moleculares da inflamação (citocinas) liberados pelo tecido lesado e células promovem quimiotaxia e mobilização de fagócitos para o sítio da invasão (Stuart e Ezekowitz, 2005).

Os neutrófilos e macrófagos têm grande importância na defesa do organismo contra bactérias, pois fagocitam os microrganismos e os destroem principalmente devido à ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante a explosão respiratória (“burst” oxidativo) (Afonso et al., 1998), reação estimulada pela presença de microrganismos e causada pela ação de enzimas hidrolíticas (Secombes, 1996). Durante a resposta inflamatória, as células tendem a migrar devido a fatores de quimiotaxia liberados no foco inflamatório. Os neutrófilos são os primeiros granulócitos que chegam ao sítio lesado e, em seguida, os monócitos/macrófagos. Os neutrófilos migram da corrente sanguínea e os macrófagos são derivados dos monócitos sanguíneos. No local da lesão, estas células iniciam o processo de fagocitose, com destruição dos agentes invasores (Rowley e Hunt, 1988; Rowley, 1996).

Durante o processo da fagocitose ocorre grande aumento do consumo do oxigênio molecular, mecanismo conhecido como “burst” oxidativo, que decorre da redução do oxigênio em ânion superóxido que, pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), forma peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Este peróxido de hidrogênio sofre ação da enzima mieloperoxidase (MPO) liberada pelos leucócitos granulares, se transformando em hipoclorito e levando à produção de cloraminas. Todas estas espécies reativas de oxigênio (EROs) são substâncias oxidantes que atuam sobre membranas de microorganismos e contribuem ativamente para sua destruição (Verlhac e Gabaudan, 1997; Verlhac et al., 1998).

Os peixes, assim como os mamíferos, possuem mastócitos, células granulocíticas encontradas na pele, mucosa e tecido conjuntivo. Sua função é semelhante aos mamíferos, exceto por alguns componentes efetores, tais como a histamina. Entretanto, produzem diversos outros mediadores quimiotáticos para

leucócitos, que são liberados quando em contato com o agente invasor (Reite, 1972; Reite, 1998; Reite e Evensen, 2006; Vallejo e Ellis, 1989).

As células de defesa do sistema inato têm também a função de realizar a ligação com o sistema adquirido. Esta relação é realizada pelas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) que após processamento apresenta o agente invasor, com a ajuda de moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Maior, Classe 2, para linfócitos T, iniciando assim a resposta adquirida mediada por células (Tizard, 2002).

## **2.2. Sistema Complemento**

Os componentes do sistema inato estão divididos em fatores humorais e celulares. Entre os componentes humorais, o sistema complemento é um dos mais importantes para a defesa contra invasores bacterianos (Koppenheffer, 1987), além de ser considerado um dos principais mediadores do processo inflamatório (Matsuyama et al., 1988; Nonaka et al., 1981; Ourth e Wilson, 1982; Roed et al., 1992). O sistema complemento é composto por cerca de 35 proteínas, que podem estar solúveis no plasma ou ainda nas membranas de algumas células, que atuam nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (Secombes, 1996).

As proteínas normalmente são encontradas na circulação na forma inativa ou em baixos níveis de ativação espontânea, e sua ativação ocorre de maneira sequencial, em efeito cascata, graças a um estímulo inicial em que cada componente contribui para a proteólise do próximo componente a ser ativado. A ativação pode ocorrer por três vias: i) via clássica, ativada por complexo antígeno-anticorpo, dependente de anticorpo; ii) via alternativa, ativada por moléculas de superfície de microrganismos e por complexo antígeno-anticorpo; iii) via lectina, ativada por ligação de carboidratos de superfície bacteriana, sendo as três vias identificadas em peixes (Holland e Lambris, 2002).



O sistema complemento é muito utilizado como indicador da condição imune e atua na defesa orgânica, na ativação celular, fagocitose, quimiotaxia, reação inflamatória e lise de células estranhas e patógenos (Robertsen, 1999; Bayne e Gerwick, 2001). Um modo de medir a atividade da via alternativa do complemento é a determinação da atividade hemolítica do soro, quando esta via é ativada por eritrócitos estranhos (Yano, 1992). Diversos fatores podem influenciar a ativação e atividade lítica do complemento, tais como infecções, contaminação ambiental e desnutrição (Holland e Lambris, 2002).

As funções do sistema complemento são inúmeras, contudo a capacidade de destruir patógenos através de lesões na membrana, comumente caracterizada por poros, é a mais conhecida. A ativação e consequente destruição dos invasores podem ocorrer pelas três vias, entretanto, a ativação pela via clássica, mediada por complexo antígeno e anticorpo (Ag-Ac), indica que o sistema complemento realiza uma interação dos sistemas inato e específico. Assim, uma das funções do sistema complemento é a imunomodulação do sistema adquirido (Fearon e Locksley, 1996; Carroll e Prodeus, 1998; Sahu e Lambris, 2001).

### **2.3. Inflamação**

A inflamação é uma resposta do sistema inato, inicialmente caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo e pela presença de neutrófilos, seguido pela chegada de monócitos e macrófagos no sítio lesado ou foco da inflamação, onde irão realizar fagocitose. Os neutrófilos são oriundos do rim cranial e liberados na corrente sanguínea. Inicialmente, após estímulo dos mediadores químicos liberados na lesão tecidual, estas células permanecem próximas do endotélio vascular através de ligação com receptores (clatrininas). Devido a estímulos químicos, há aumento da permeabilidade da membrana do endotélio, permitindo que os neutrófilos atravessem esta parede e cheguem ao foco inflamatório. Já os macrófagos são originados a partir dos monócitos da corrente sanguínea (oriundos do rim cranial e baço) e quando

alcançam o foco, são estimulados por mediadores químicos e apresentam fagocitose aumentada e grande capacidade microbicida (Rowley et al., 1988; Rowley, 1996; Tizard, 2002).

A inflamação pode ser considerada aguda ou crônica. As lesões agudas são reparadas em poucos dias e após infiltração celular e fagocitose, o foco inflamatório é reconstruído (Roberts, 1989). Já as lesões crônicas ocorrem quando a fagocitose não destruiu todos os microrganismos invasores. É caracterizada pelo aparecimento de linfócitos e aumento das concentrações de macrófagos e monócitos. Quando o agente causal ainda permanece intacto no foco, os macrófagos se fundem formando células gigantes, multinucleadas que formam granulomas epiteliais com capacidade de secretar enzimas hidrolíticas que destroem todo material capturado no granuloma (Ramakrishna et al., 1993). O processo inflamatório é controlado por citocinas pró-inflamatórias, produzidas por macrófagos ativados, e citocinas antiinflamatórias, que diminuem o processo inflamatório (Sullivan e Kim, 2008).

#### **2.4. Complexo principal de histocompatibilidade (MHC)**

As moléculas de histocompatibilidade são receptores glicoprotéicos codificados por genes em um complexo gênico do genoma denominado complexo de histocompatibilidade maior (MHC), que são expressos em quase todas as células do organismo. Exercem função importante para o reconhecimento de antígenos endógenos e exógenos. As moléculas do MHC são divididas em classe I e II. As moléculas de classe I se ligam aos receptores de células T citotóxicas (glicoproteína CD8) e promovem a apresentação de antígenos derivados de peptídeos endógenos (células tumorais ou contendo agente intracelular) para estes linfócitos, por outro lado, as moléculas classe II ligam-se aos receptores de células T auxiliares (glicoproteína CD4) e promovem a apresentação de antígenos derivados de peptídeos exógenos (componente de bactérias, vírus, fungos ou parasitas) a estes linfócitos (Klein et al., 2007; Rakus et al., 2009). A perfeita ligação e apresentação do antígeno podem

influenciar nas respostas do organismo frente ao patógeno. Antígenos não identificados pelas moléculas do MHC podem promover mais doenças (Klein et al., 2007).

As moléculas do MHC apresentam capacidade de reconhecer antígenos, entretanto não apresentam a especificidade dos receptores de células T e das imunoglobulinas de membranas das células B. Cada molécula do MHC pode se ligar com vários tipos de antígenos correlatos (Goldsby et al., 2002).

## **2.5. Linfócitos: subpopulações e funções**

O sistema imune específico atua através de componentes humorais e celulares reconhecendo e destruindo microrganismos invasores, tais como bactérias, fungos, vírus e parasitos, para proteger o organismo. Para realizar sua função, este sistema pode produzir componentes humorais, os anticorpos, que se ligam e marcam os agentes invasores para serem destruídos por células, ou ainda podem realizar defesa mediada por células, na qual os linfócitos B e T se ligam ao agente e o destroem, e ainda liberam sinais químicos que irão atrair mais células para destruí-lo (Abbas e Lichtman, 2004).

### **2.5.1. Células B**

A porção cranial do rim é o órgão principal na produção dos linfócitos B, entretanto o baço e tecidos linfóides associados à mucosa (trato gastrointestinal, pele e brânquias) também são produtores desta célula e suas subpopulações, os linfócitos B de memória e os efetivos (plasmócitos ou células plasmáticas) (Bromage et al., 2004; Langenau et al., 2004; Rombout et al., 1998; Zwollo et al., 2005). As células B perfazem de 25 a 50% de todas as células sanguíneas dependendo da espécie de peixe (Miyadai et al., 2004; Hansen et al., 2005), sendo esta concentração mais elevada que a encontrada em mamíferos (Li et al., 2006).

Os linfócitos B expressam em sua membrana moléculas especiais, com capacidade de reconhecer antígenos com alta especificidade, são os anticorpos. As células B naive, aquelas que não se ligam ao antígeno, quando encontram o antígeno compatível, iniciam sua divisão e sua progênie se diferencia em células B de memória ou células B efetivas que se transformam em outro tipo celular, os plasmócitos (Goldsby et al., 2002). Os plasmócitos são células efetivas derivadas da maturação do linfócito B, produtoras de imunoglobulinas (Zhao et al., 2008)

#### **2.5.1.1. Células B de memória**

As células de memória apresentam vida mais longa comparada com os linfócitos B naive, e expressam na membrana anticorpos iguais aos produzidos pelos progenitores (Goldsby et al., 2002).

#### **2.5.1.2. Células B efetoras**

As células B efetoras, após ligação com os antígenos, transformam-se em plasmócitos, que são células produtoras de anticorpos. Estes anticorpos podem ser secretados para os fluidos do organismo (Goldsby et al., 2002).

#### **2.5.2. Células T**

O timo é o principal órgão produtor e centro de maturação de células T e suas subpopulações (Bowden, 2005). Semelhante aos linfócitos B, os linfócitos T após interação com o antígeno podem se diferenciar nos linfócitos T auxiliares, citotóxicos e de memória. Os linfócitos auxiliares regulam as respostas imunes, os linfócitos citotóxicos destroem os antígenos endógenos, e os de memória são responsáveis em

responder prontamente a uma segunda invasão. Estas células podem ser diferenciadas devido à presença de glicoproteínas de membrana chamadas CD4 (presentes nos linfócitos auxiliares) e CD8 (presentes nos linfócitos citotóxicos) (Tizard, 2002).

As células T são muito importantes na resposta específica mediada por células e após ligação com o antígeno liberam fatores que atuam sobre macrófagos promovendo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, melhorando a capacidade de defesa do organismo (Secombes, 1996).

#### **2.5.2.1. Células T auxiliares**

Os linfócitos T auxiliares apresentam receptores capazes de reconhecer antígenos específicos, entretanto só o fazem quando este antígeno é proveniente de patógeno previamente processado por células apresentadoras de antígenos e ligado a um agente facilitador, chamado de moléculas de histocompatibilidade, que são receptores glicoprotéicos provenientes do MHC de classe 2 (Tizard, 2002). Após o reconhecimento, as células T são estimuladas a se dividirem e produzir novas células T específicas para aquele antígeno detectado, bem como a liberar fatores químicos, chamados de citocinas, que amplificam a resposta imune (Abbas e Lichtman, 2004).

As citocinas dos linfócitos T apresentam função importante na defesa contra os patógenos. Estes fatores possuem capacidade de ativar as células B, linfócitos T citotóxico, macrófagos e outras células que atuam na destruição dos agentes invasores (Goldsby et al., 2002).

#### **2.5.2.2. Células T citotóxicas**

Os linfócitos T citotóxicos são células muito importantes na defesa do organismo contra microrganismos intracelulares (bactérias ou vírus), bem como células anormais (tumoriais), uma vez que anticorpos e células T auxiliares ou de memória não

apresentam capacidade de detectar antígeno intracelular. Os antígenos dos agentes estranhos podem estar na membrana ou dentro da célula do organismo, e após a identificação, estas células são destruídas, através da indução de apoptose e assim evita-se a disseminação do agente pelas células vizinhas. Este processo é denominado citotoxicidade mediado por células (Tizard, 2002).

As células T citotóxicas também necessitam de agente facilitador, chamado de moléculas de histocompatibilidade, que são receptores glicoprotéicos provenientes do MHC de classe 1 (Tizard, 2002). As moléculas do MHC-1 também são expressas na membrana de muitas células do organismo, e quando estas células são infectadas com agente intracelular, a expressão do antígeno juntamente com a molécula do MHC-1 promove uma situação favorável para reconhecimento e ativação do linfócito T citotóxico, conseqüentemente, o último induz a apoptose na primeira destruindo o agente endógeno (Goldsby et al., 2002).

### **2.5.2.3. Células T de memória**

Semelhante à célula B, a célula T é capaz de produzir células de memória com receptores específicos. Assim, o organismo desenvolve memória imune e em uma segunda invasão a resposta imune é mais rápida e intensa (Abbas e Lichtman, 2004).

## **2.6. Anticorpos**

Os anticorpos são glicoproteínas denominadas imunoglobulinas (Ig) que podem ser expressas na membrana do linfócito B (BCR) ou ainda ser secretada para fluidos corpóreos pelos plasmócitos (linfócitos B ativados após ligação com antígeno) (Goldsby et al., 2002), ou ainda considerados formas solúveis do BCR (Tizard, 2002). Os mamíferos possuem cinco classes de imunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, diferindo em forma e local de atuação (Tizard, 2002). Entretanto em peixes, a

imunoglobulina prevalente é a IgM, que é uma proteína tetramérica com quatro sítios para reconhecimento de antígeno (Bogwald et al., 1991). Alguns pesquisadores observaram outras imunoglobulinas em algumas espécies de peixes, tais como a IgD (Wilson et al., 1997, Hirono et al., 2003), IgZ (Danilova et al., 2005) e a IgT (Hansen et al., 2005). As imunoglobulinas podem ser encontradas no soro e fluidos corpóreos (Ellis, 2001), muco, ovos (Solem, 2006) e no trato gastrintestinal (Peleteiro e Richards, 1985; Davidson et al., 1993; Rombout e Joosten, 1998).

Os receptores antigênicos dos anticorpos são formados de forma aleatória, durante o desenvolvimento da célula B com especificidade única, resultado de um rearranjo gênico ordenado. As células B são ainda selecionadas de acordo com a afinidade de ligação ao antígeno; assim células que apresentam pouca afinidade com antígenos não sobrevivem ou deixam células de memória. Os genes que expressam as Igs apresentam uma série complexa de rearranjos cromossômicos, além de realizar mutações somáticas, a fim de promover um repertório longo de receptores antigênicos com Ig de alta especificidade (Tizard, 2002).

Os anticorpos podem apresentar variações, entre eles, os anticorpos antiadesinas, presentes no epitélio superficial do sistema digestório (Davidson et al., 1993), brânquias (Davidson et al., 1997; Joosten et al., 1997) e pele (Rombout et al., 1993), apresentando ainda capacidade de evitar a adesão de bactérias na superfície celular (Ellis, 2001). Os anticorpos antitoxinas neutralizam as toxinas produzidas por diversas bactérias (Gudmundsdottir e Magnadottir, 1997); já os anticorpos antiinvasinas, impedem que bactérias penetrem em células não fagocíticas, que possuem menos componentes de defesa (Magarinos et al., 1996b). O sistema complemento, ativado pela via clássica, é dependente de anticorpos e ativado por imunocomplexos (anticorpo ligado ao antígeno) cuja ativação resulta em deposição de proteínas na parede celular dos patógenos e consequente danos nas membranas que culminam em citólise (Ellis, 2001).

Após o reconhecimento do antígeno, através das imunoglobulinas da membrana do linfócito B, pode ocorrer a produção de células B de memória, bem como endocitose (função de célula apresentadora de antígenos) com consequente expressão de

moléculas do MHC-2 e ativação de imunidade mediada por linfócitos T, que culminará em produção de citocinas ativadoras de células B, macrófagos, entre outras (Tizard, 2002).

A concentração de anticorpos no soro pode variar de acordo com a espécie, idade, maturidade sexual e por alterações promovidas por eventos fisiológicos (naturais ou artificiais – esmoltificação, aplicação de cortisol) (Hordvik et al., 1992; Miller et al., 1985; Ryczyn et al., 1996; Ross et al., 1998; van Ginkel et al., 1994; Wilson et al., 1990; Wilson et al., 1995; Wilson et al., 1997). Entretanto a estimulação pela presença do antígeno, pela imunização artificial ou devido à infecção crônica, aumenta claramente as concentrações de anticorpos circulantes (Hordvik, 2002; Zhao et al., 2002; White et al., 1985).

## **2.7. Imunização**

A imunização é uma prática que visa, dentre outros benefícios, o aumento da concentração de anticorpos circulantes, pela sensibilização do animal pelo antígeno. Uma vacina ideal deve conferir forte imunidade e por período prolongado (Tizard, 2002). O imunógeno utilizado na vacina não é patogênico, podendo ser proveniente de microrganismos patogênicos inativados por tratamento químico ou calor, ou ainda atenuados (Parslow, 2004).

Na aquicultura, a imunização pode-se constituir em uma alternativa ao uso de antibióticos, uma vez que peixes vacinados devem apresentar resistência contra o agente inoculado (Romano e Mejía, 2003; Thorarinsson e Powell, 2006). A administração da vacina pode ser realizada por injeção, por via oral ou imersão. Cada método apresenta suas vantagens e desvantagens, envolvendo a resposta de imunização esperada, praticidade de uso, bem como custo. Entretanto a eficácia da imunização depende da idade, temperatura da água, do agente inoculado e do método de vacinação (Gudding et al., 1999).



A injeção por via intraperitoneal é a forma mais eficaz e confiável, por outro lado, é muito invasiva e estressante para peixes, além de apresentar custo elevado (Nakanishi et al., 2002). A vacinação por imersão, na qual o imunógeno é diluído em tanques pequenos e os peixes entram em contato através das mucosas, é muito utilizada em peixes pequenos e em grandes quantidades, entretanto o volume de vacina deve ser muito grande, o que leva a problemas de descarte do resíduo do processo (Bombardelli e Hayashi, 2005; Nakanishi e Ototake, 1997). Já vacinação por via oral, incorporada à ração, é um método não invasivo, de custo moderado e que não necessita de mão de obra qualificada para aplicação; entretanto a vacina necessita resistir ao processo digestivo até sua completa absorção (Thorarinsson e Powell, 2006).

No Brasil ainda não há vacinas comerciais licenciadas para a indústria aquícola. Os primeiros estudos foram realizados por Pilarski (2006) em tilápias do Nilo. Neste estudo a administração de 500mg de ácido ascórbico incorporado à dieta potencializou o efeito da vacina atenuada contra *Flavobacterium columnare*. Ainda, de acordo com Pilarski et al (2009), resultados positivos foram observados em tilápias alimentadas com  $\beta$ -glucano e imunizadas com cepas inativadas de *Flavobacterium columnare* em veículo oleoso.

## **2.8. Imunoestimulantes e imunomodulação em peixes**

### **2.8.1. Levamisol**

Algumas substâncias podem influenciar as respostas do sistema imune de peixes, como o levamisol, uma droga anti-helmíntica sintética utilizada em mamíferos, e que apresenta uma potente ação imunoestimulante em peixes através da modulação de parâmetros imunes, como atividade citotóxica de leucócitos, fagocitose, atividade respiratória de leucócitos, aumento de proteínas séricas líticas e produção de anticorpos (Cuesta et al., 2002; 2004).

O levamisol é usado em animais terrestres para controle de parasitas do trato digestório e vias pulmonares (JECFA, 1991). Foi o primeiro fármaco relacionado com funções de melhora da imunidade celular em animais de laboratório (Renoux, 1980). Este fenômeno foi confirmado nos anos 80, em um estudo com truta arco-íris (Siwicki, 1989).

Este composto tem mostrado um potente efeito imunoestimulante em diversas espécies de peixes, entre elas a carpa, *Cyprinus carpio* (Siwicki, 1987, 1989; Baba et al., 1993), *Labeo rohita* (Sahoo e Mukherjee, 2001, 2002), truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Kajita et al., 1990; Siwicki et al., 1994), *Sparus aurata* (Mulero et al., 1998), *Salmo salar* (Findlay e Munday, 2000), *Morone chrysops* × *M. saxatilis* (Peng et al., 2004), *Rachycentron canadum* (Leano et al., 2004) e *Clarias batrachus* (Kumari e Sahoo, 2006), modulando principalmente a atividade citotóxica de leucócitos (Cuesta et al., 2002), fagócitos (Mulero et al., 1998; Findlay e Munday, 2002), atividade respiratória de macrófagos (Siwicki, 1989; Mulero et al., 1998), e melhora das respostas imune específica (Jeney e Anderson, 1993; Cuesta et al., 2004).

Este fármaco tem mostrado uma capacidade de melhorar a resistência contra diversos agentes infecciosos, tais como *Vibrio anguillarum* (Kajita et al., 1990), *Aeromonas hydrophila* (Baba et al., 1993), *Paramoeba* sp. (Findlay et al., 2000; Munday e Zilberg, 2003), *Edwardsiella tarda* (Sahoo e Mukherjee, 2002), *Photobacterium damsela* (Leano et al., 2004) além de nematóides como *Anguillicola crassus* (Geets et al., 1992).

O levamisol pode ser facilmente administrado por via oral, pela suplementação da ração, sendo assim um imunoestimulante efetivo e de administração não invasiva. Além de atuar no sistema imune, também aumenta a taxa de crescimento e ganho de peso, como observado em *Sparus aurata* (Mulero et al., 1998) e *Cyprinus carpio* (Siwicki e Korwin-Kossakowski, 1988). Em pacus, Sado et al. (2010) observaram resultados positivos nos parâmetros hematológicos quando alimentados com 100mg/kg levamisole por 15 dias. Alguns estudos demonstraram que a injeção de levamisol por via intraperitoneal e banhos de imersão promoveram alterações nas respostas imunes inespecíficas e produção de anticorpos (Jeney e Anderson, 1993; Midtlyng et al., 1996).

## 2.9. *Aeromonas hydrophila*

A *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria gram negativa, não encapsulada com respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa, tem a forma de bastonete móvel, possui flagelos polares e não produz esporos, além de ter ampla distribuição geográfica (Stoskopf, 1993). Considerado um dos mais importantes patógenos oportunistas de peixes de água doce, é o agente etiológico da septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de petéquias, equimoses e grandes lesões na superfície da pele, principalmente no opérculo e nas brânquias, além de causar lesões ulcerativas em toda a extensão do corpo, exoftalmia e distensão abdominal. Pode levar ao acúmulo de líquido abdominal (ascite), lesões hepáticas e nos rins e anemia (Austin e Austin, 1988). A doença causada pela *A. hydrophila* é considerada uma zoonose, uma vez que pode contaminar água e alimentos e provocar enfermidades no homem, tais como febre, dor abdominal, vômitos, diarreia, meningite, endocardite, septicemia, inflamações diversas entre outros (Janda e Abbott, 1998; Vivas, et al, 2004; Castilho, et al. 2009).

O aparecimento da doença causada por *A. hydrophila* está comumente relacionada ao excesso de matéria orgânica na água (Post, 1987) e com situações de estresse ou presença de parasitos. Assim, o aparecimento da doença causada por *A. hydrophila* pode significar risco para a saúde dos peixes, dos trabalhadores e dos consumidores (Vieira, 2003). A *Aeromonas* é um dos mais importantes patógenos presentes em pisciculturas no Brasil (Godoy et al., 2008).

A doença provocada pela *A. hydrophila* é considerada um grave problema econômico, devido à pronunciada mortalidade e aos sinais característicos da doença, que impossibilitam o comércio do pescado (Vieira, 2003). Na tentativa de mitigar os efeitos negativos da doença, o uso indiscriminado de antibióticos em doses sub-terapêuticas nas rações dos peixes resultaram em aumento da resistência bacteriana em todo o mundo (Vivekanandhan et al., 2002). Diante deste problema, diversas pesquisas são realizadas visando promover a utilização de imunoestimulantes na

aqüicultura, sendo esta uma alternativa ao uso de antibióticos e a prevenção de enfermidades.

### **3. MODELO BIOLÓGICO**

O modelo biológico utilizado neste estudo é a espécie *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887, pertencente à família Characidae e subfamília Myleinae, comumente conhecido como pacu, cuja ocorrência é conhecida desde a bacia do rio Orinoco na Venezuela até o rio da Prata no Uruguai. O pacu possui importantes características zootécnicas que o tornaram um dos peixes mais importantes da aquicultura brasileira (Oliveira et al., 2004; Queiroz et al., 2005). Por essas razões e devido à falta de informações sobre o tema proposto, a espécie foi escolhida como modelo biológico desse experimento.

### **4. OBJETIVOS GERAIS**

O presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas imunes inatas e adquiridas de pacus alimentados com ração suplementada com levamisol.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHMAN, A.H. **Basic Immunology**. Functions and disorders of the immune system. 2004.
- AFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A.E.; SILVA, M.T. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 34, p. 27-37, 1998.
- ALAYE-RAHY, N. Hematologia de aterinidos de aguas dulces: gênero *Chirostoma* spp. del lado de Patzcuaro, Mich. **Ciencia Pesquera**, v.10, p.97-109, 1993.
- ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 20, p.281–307, 1992.
- ARASON, G. J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish and Shellfish Immunology**, v.6, p.277–289, 1996.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish**. 3rd Edition. Springer Praxis, Chichester, England. 1999.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Patologia en acuicultura**. In: BARJA, J.L.; ESTEVES, A.T. Enfermedades bacterianas, Madrid: Caicy, 1988. 550p.
- AVILÉS-TRIGUEROS, M., QUESADA, J. A. Presence of interdigitating cells in thymus of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleost). **Journal of Morphology**, v.224, p.199–203, 1995.
- BABA, T.; WATASE, Y.; YOSHINAGA, Y. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.59, p.301–307, 1993.
- BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Haworth Press, 2001. p.213-225.
- BARREDA, D.R.; BELOSEVIC, M. Development of macrophages of cyprinid fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, p.411–429, 2009.
- BAYNE, C.J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p.725-743, 2001.
- BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. In: EVANS, D.H. **The physiology of fishes**. 2ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.215-242.

BINGULAC-POPOVIC, J.; FIGUEROA, F.; SATO, A.; TALBOT, W.S.; JOHNSON, S.L.; GATES, M.; POSTLETHWAIT, J.H.; KLEIN, J. Mapping of MHC class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. **Immunogenetics**, v.46, p.129–134, 1997.

BOGWALD, J.; STENSVAG, K.; HOFFMAN, J.; JØRGENSEN, T. Antibody specificities in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., against the fish pathogens *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. **Journal of Fish Disease**, v.14, n.1, p.79–87, 1991.

BOMBARDELLI, R.A.; HAYASHI, C. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com 17 $\alpha$ -metilttestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p. 364-372, 2005.

BOWDEN, T.J.; COOK, P.; ROMBOUT, J.H. Development and function of the thymus in teleosts. **Fish and Shellfish Immunology**, v.19, p.413–27, 2005.

BRAUN, R.; ARNESEN, J.A.; RINNE, A.; HJELMELAND, K. Immunohistological localisation of trypsin in mucus-secreting layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases**, v.13, p.233–238, 1990.

BRATTGJERD, S.; EVENSEN Ø. A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in the head kidney phagocytes of experimentally infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Veterinary Pathology**, v.33, p.55–65. 1996.

BRATTGJERD, S.; EVERSEN, O.; LAUVE, A. Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon *Salmo salar* L., as evaluated by in vitro hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. **Immunology**, v.83, p.288-294, 1994.

BROMAGE, E.S.; KAATTARI, I.M.; ZWOLLO, P.; KAATTARI, S.L. Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. **Journal of Immunology**, v.173, n.12, p.7317–23, 2004.

BULLEN, J.J.; GRIFFITHS, E. **Iron and Infection** – Molecular, Physiological and Clinical Aspects. Chichester: Wiley. 1987.

CARROLL, M.C.; PRODEUS, A.P. Linkages of innate and adaptive immunity. **Current Opinions in Immunology**, v.10, p.36–40, 1998.

CASTILLHO, M.C.B.; CASTRO, T.L.A.; ARAÚJO, V.S.; TRAJANO, R.S.; SANTOS, P.A.; PIMENTA, P.M.C.; LUCHEZE, K.; MELO, J.T.B.; GOMÇALVEZ, AM.; NOGUEIRA, R.T.; LUNA, M.G.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. High frequency of hemolytic and citotoxic

activity in *Aeromonas* ssp. Isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, p.53-61, 2009.

CUESTA, A.; ANGELES ESTEBAN, M.; MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, p.161-171, 1999.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Levamisole is a potent enhancer of gilthead sea bream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.89, p.169–174, 2002.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Total serum immunoglobulin M are affected by immunomodulators in sea bream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.203–210, 2004.

DALMO, R.A., INGEBRIGTSEN, K., BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Disease**, v.20, p.241-273, 1997.

DANILOVA, N.; BUSSMANN, J.; JEKOSCH, K.; STEINER, L.A. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin. **Nature Immunology**, v.6, n.3, p.295-302, 2005.

DAVIDSON, G. A.; ELLIS, A. E.; Secombes, C. J. Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Developmental and Comparative Immunology**, v.17, p.373–376, 1993.

DAVIDSON, G.A.; LIN, S-H.; SECOMBES, C.J.; ELLIS, A.E. Detection of specific and constitutive antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.58, p.363–374, 1997.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. **The immune system: first of two parts**. New England Journal of Medicine. v.343, n.1, p. 37-49, 2000a.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. **The immune system: second of two parts**. New England Journal of Medicine. v.343, n.2, p.108-117, 2000b.

ELLIS, A.E. The leucocytes of fish: a review. **Journal of Fish Biology**, v.11, p.453–491, 1977.

ELLIS, A.E. Immunity to bacteria in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p.291–308, 1999.

ELLIS, A.E. Innate host defense mechanism of fish against virus and bacteria. **Development and Comparative Immunology**, v.25, p.827-839, 2001.

ELWARD, K.; GASQUE, P. “Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. **Molecular Immunology**, v.40, p.85-94, 2003.

EVANS, D.L.; JASO-FRIEDMANN, L. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.109–121, 1992.

EVANS, T. Developmental biology of hematopoieses. **Hematology and Oncology of Clinic North America**, v.11, n.6, p.1115-1147, 1997.

FARAG, S.S.; FEHNIGER, T.A.; RUGGERI, L.; VELARDI, A.; CALIGIURI, M.A. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus leukemia effect. **Blood**, v.100, n.6, p.1935-1947, 2002.

FEARON, D.T.; LOCKSLEY, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, v.272, p.50–53, 1996.

FINDLAY, V.L.; MUNDAY, B.L. The immunomodulatory effects of levamisole on the non-specific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Disease**, v.23, p.369–378, 2002.

FINDLAY, V.L.; ZILBERG, D.; MUNDAY, B.L. Evaluation of levamisole as a treatment for amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Disease**, v.23, p.193–198, 2000.

FISHELSON, L. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes (Cichlidae, Teleostei). **Journal of Morphology**, v.223, p.175–190, 1995.

GEETS, A.; LIEWES, E.W.; OLLEVIER, F. Efficacy of some antihelminthics against the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. **Disease of Aquatic Organism**, v.13, p.123–128, 1992.

GEORGOPOULOU, U.; VERNIER, J.M. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. **Developmental and Comparative Immunology**, v.10, p.529–537, 1986.

GLOVER, K.A.; GRIMHOLT, U.; BAKKE, H.G.; NILSEN, F.; STORSET, A.; SKAALA, O. Major histocompatibility complex (MHC) variation and susceptibility to the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* in Atlantic salmon *Salmo salar*. **Disease of Aquatic Organisms**, v.76, p.57–65, 2007.



GREENLEE, A.R.; BROWN, R.A.; RISTOW, S.S. Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptic mechanisms. **Developmental and Comparative Immunology**, v.15, p.153-164, 1991.

GOLDSBY, R.A., KINDT, T.J., OSBORNE, B.A., KUBY, J. In: Immunology, 5 edição. W.H. Freeman & Company Publisher. 2002.

GONZALEZ, C.J.; SANTOS, J.A.; LOPEZ, M.L.G.; OTERO, A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii biovar sorbia* isolates from fresh water fish and from a diarrhea case. **Journal of Applied Microbiology**, v.93. p.414–419, 2002.

GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, O. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary and Immunopathology**, v.72, p.203-212, 1999.

GUDMUNDSDOTTIR, B.; MAGNADOTTIR, B. Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.7, p.55–69, 1997.

HANINGTON, P.C.; TAMB, J; KATZENBACK, B.A.; HITCHEN, S.J.; BARREDA, D.R.; BELOSEVIC, M. Development of macrophages of cyprinid fish **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, p.411–429, 2009.

HANSEN, J.D.; LANDIS, E.D.; PHILLIPS, R.B. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**, v.102, n.19, p.6919–6924, 2005.

HINE, P.M. The granulocytes of fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v.2, p.79-88, 1992.

HOLLAND, M.C.H; LAMBRIS, J.D. The complement system in teleosts. **Fish and Shellfish Immunology**, v.12, n., p.399–420, 2002.

HORDVIK, I. Identification of a novel immunoglobulin d transcript and comparative analysis of the genes encoding IgD in Atlantic salmon and Atlantic halibut. **Molecular and Immunology**, v.39, p.80-85, 2002.

HORDVIK, I.; VOIE, A-M.; GLETTE, J.; MALE, R.; ENDRESEN, C. Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmon salar* L. **European Journal of Immunology**, v.22, p.2957–2962. 1992.

IGER, Y., WENDELAAR BONGA, A.F. Cellular aspects of the skin of carp exposed to acidified water. **Cell and Tissue Research**, v.275, p.481–492, 1994.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The fish Immune System. **Fish Physiology**, v.15. 1996.

JANEWAY, C. Immunogenicity signals. **Immunology Today**, v.10, p.283-286, 1989.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical and Infectious Disease**, v.27, p.332–344, 1998.

JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1991. Levamisole. WHO Food Additive Series v.27, p.75–101.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. **Fish and Shellfish Immunology**, v.3, p.51–58, 1993.

JOHNSON, N.A.; VALLEJO, R.L.; SILVERSTEIN, J.T.; WELCH, T.J., WIENS, G.D.; HALLERMAN, E.M.; PALT, Y. Suggestive association of major histocompatibility IB genetic markers with resistance to bacterial coldwater disease in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). **Marine Biotechnology**, v.10, p.429–437, 2008.

JOOSTEN, P.H.M.; TIEMERSMA, E.; THREEELS, A.; CAUMARTIN-DHIEUX, C.; ROMBOUT, J.H.W.M. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. **Fish and Shellfish Immunology**, v.7, p.471–485, 1997.

KAJITA, Y.; SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology**, v. 25, p.93–98, 1990.

KJOGLUM, S.; LARSEN, S.; BAKKE, H.G.; GRIMHOLT, U. The effect of specific MHC class I and class II combinations on resistance to furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Scandinavian Journal of Immunology**, v.67, p.160–168, 2008.

KLEIN, J.; SATO, A.; NIKOLAIDIS, N. MHC, TSP, and origin of species: from immunogenetics to evolutionary genetics. **Annual Rev Genetic** v.41, p.281–304. 2007.

KODAMA, H.; YAMADA, F.; MURAI, T.; NAKANISHI, Y.; MIKAMI, T.; IZAWA, H. Activation of trout macrophages and production of CRP after immunization with *Vibrio anguillarum*. **Developmental and Comparative Immunology**, v.13, p.123–132, 1989.

KOPPENHEFFER, T.L. Serum complement system of ectothermic vertebrates. **Developmental and Comparative Immunology**, v.11, p.279-286, 1987.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Dietary  $\beta$ -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus*. **Journal of Fish Disease** v.29, p.95-101, 2006.

LANGENAU, D.M.; FERRANDO, A.A.; TRAVER, D.; KUTOK, J.L.; HEZEL, J.P.; KANKI, J.P. In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.7369-7374, 2004.

LEANO, E.M.; GUO, J.J.; CHANG, S.L.; LIAO, I.C. Levamisole enhances non-specific immune response of Cobia, *Rachycentron canadum*, fingerlings. **Journal of Fish Society of Taiwan**, v.30, p.321–330, 2004

LI, J.; BARREDA, D.R.; ZHANG, Y.A.; BOSHRA, H.; GELMAN, A.E.; LAPATRA, S. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. **Nature Immunology**, v.7, p.1116–24, 2006.

LIN, S.H.; DAVIDSON, G.A.; SECOMBES, C.J.; ELLIS, A.E. A morphological study of cells isolated from the perfused gill of dab and Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**, v.53, p.560–568, 1998.

LOBB, C.J. Secretory immunity induced in catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization. **Developmental and Comparative Immunology**, v.11, p.727– 738, 1987.

MAGARINOS, B.; ROMALDE, J. L.; NOYA, M.; BARJA, J. L.; TORANZO, A. E. Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. **FEMS Microbiology Letters**, v.138, p.29–34, 1996.

MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, v.20, p.137-151, 2006.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B. Falha na resposta do cortisol estresse por captura e por carregina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae). **Revista brasileira de Zoologia**, v.12, p. 545-552, 2000.

MASSA, S.; ALTIERI, C.; D'ANGELA, A. The occurrence of *Aeromonas spp.* in natural mineral water and well water. **Int. Journal of Food Microbiology** v.63, p.169–173, 2001.

MATSUYAMA, H.; NAKAO, M.; YANO, T. Compatibilities of antibody and complement among different fish species. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.54, p.1993-1996, 1988.

MESEGUER, J.; ESTEBAN, A.M.; LOPEZ-RUIZ, A.; BIELEK, E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). **The Anatomical Record**, v.239, p.468-474, 1994.

METCALF, D.; NICOLA, N.A. **The hematopoietic colony-stimulating factors**: From biological to clinical applications. New York: Cambridge University Press. 1995.

MILLER, N.W.; SIZEMORE, R.C.; CLEM, L.W. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leukocytes. **Journal of Immunology**, v.134, p.2884–2888, 1985.

MIYADAI, T.; OOTANI, M.; TAHARA, D.; AOKI, M.; SAITOH, K. Monoclonal antibodies recognising serum immunoglobulins and surface immunoglobulin-positive cells of puffer fish, torafugu (*Takifugu rubripes*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.17, p.211–22, 2004.

MOORE, J.D.; OTOTAKE, M.; NAKANISHI, T. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the role of the skin and gills. **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.393–407, 1998.

MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MUNOZ, J.; MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.49–62, 1998.

MUNDAY, B.L.; ZILBERG, D. Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. **Bulletin of European Association of Fish Pathology**, v.23, p.3–6, 2003.

MURRAY, C.K.; FLETCHER, T.C. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. **Journal of Fish Biology**, v.9, p.329–334, 1976.

NAKANISHI, T.; OTOTAKE, M. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: Gudding, R.; Lillehaug, A.; Midtlyng, P.J. et al., editors. **Fish Vaccinology**. p.59–68. 1997.

NAKANISHI, T.; KIRYU, I.; OTOTAKE, M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. **Vaccine**, v.20, p. 3764–3769, 2002.

NAKANISHI, Y.; KODAMA, H.; MURAI, T.; MIKAMI, T.; IZAWA, H. Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. **American Journal of Veterinary Research** v.52, p.397–401, 1991.

NELSON, J. S. 1994. **Fishes of the World**. 3rd edn. New York: John Wiley.

NEUMANN, N.F.; STAFFORD, J.L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A.J.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p.807–25, 2001.

NONAKA, M.; YAMAGUCHI, N.; NATSUUME-SAKAI, S.; TAKAHASHI, M. The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement. **The Journal of Immunology**, v.126, p.1489-1494, 1981.

OHTA, M.; OKADA, M.; YAMASHITA, I. The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannose-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.1980–1984. 1990.

OLIVEIRA, A.M.B.M.S.; CONTE, L.; POSSEBON, J.E. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt; **Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática**, p.217-238. 2004.

OURTH, D.D.; WILSON, E.A. Alternate pathway of complement and bactericidal response of the channel catfish to *Salmonella paratyphi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v.6, p.75-85, 1982.

PARSLOW, T.G.; BAINTON, D.F. Imunidade inata. In: Paslow, T.G.; Stites, D.P.; Terr, A.I.; Imboden, J.B. (Eds.) **Imunologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 16-33.

PELETEIRO, M. C.; RICHARDS, R. H. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdnei* Richardson. **Journal of Fish Diseases**, v.8, p.161–172. 1985.

PENG, L.; WANG, X.; GATLIN III, D.M. Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid striped bass, *Morone chrysops* × *M. saxatilis*, and elevated levamisole in vitro impairs macrophage function. **Aquatic Research**, v.35, p.1380–1383, 2004.

PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.33, p.15-18, 1996.

PILARSKI, F.; CHAGAS, E.C.; VARANDAS, D.N.; SAKABE, R. 2009. Effect of B-glucan supplementation in the juvenile *Oreochromis niloticus* vaccinated against *Flavobacterium columnare*: non-specific immune parameters. In: Worl Aquaculture, 2009. Veracruz Anais. Worl Aquaculture Society.

PILARSKI, F. Imunização de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com antígeno obtido de *Flavobacterium columnare* e suplementação alimentar com vitamina C. 2006. 188p. Tese. Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

PLYZYCZ, B.; FLORY, C.M.; GALVAN, I.; BAYNE, C.J. Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion. **Developmental and Comparative Immunology**, v.13, p.217-224, 1989

POST, G. **Textbook of fish health**. New York: T.F.H. Publications, 1987. 288p.

PRESS, C. MCL.; EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p.309–318, 1999.

PRESS, C. MCL.; DANNEVIG, B. H.; LANDSVERK, T. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). **Fish and Shellfish Immunology**, v.4, p.79–93, 1994.

QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C.; SCORVO FILHO, J.D.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.C.; BERNARDINO, G. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture Magazine**, v.36, p.45-50, 2005.

RAKUS, K.L.; WIEGERTJES, G.F.; JURECKA, P.; WALKER, P.D.; PILARCZYK, A.; IRNAZAROW, I. Major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism influences disease resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture** v.288, p.44–50, 2009.

RAMAKRISHNA, N.R.; BURT, M.D.B.; MacKINNON, B.M. Cell-mediated immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea) following sensitization to live sealworm, sealworm extract, and nonhomologous extracts. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences**, v.50, p.60-65, 1993.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos em piratinga do sul, Brycon sp., sob condições experimentais de criação intensiva. **Revista Ceres**, v.43, p.685-696, 1996

RAULET, D.H. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. **Nature Immunology**, v.5, p.996-1002, 2004.

REITE, O.B. Comparative physiology of histamine. **Physiological Reviews**, v.52, p.778-819. 1972.

REITE, O.B. Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.489-513, 1998.

REITE, O.B.; EVENSEN, O. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. **Fish and Shellfish Immunology**, v.20, p.192-208, 2006.

RENOUX, G. The general immunopharmacology of levamisole. **Drugs** v.19, p.89–99, 1980.

ROBERTS, R. J. 1975. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In *The Pathology of Fishes* (W. E. Ribelin & G. Migaki eds), p. 399–428. Madison: University of Wisconsin Press.

ROBERTS, R.J. The immunology of Teleost. In: - **Fish Patology**. London: Bailliere Tindall, 1989. p.135-150.

ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish and Shellfish Immunology**. v.9, n.4, p.269–290, 1999.

ROED, K.H.; FJALESTAD, K.; LARSEN, H.J.; MIDTHJEL, L. Genetic variation in haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Fish Biology**, v.40, p.739-750, 1992.

ROMANO, L.A.; MEJÍA, J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista Aquatica**, v.18. p.25-32. 2003.

ROMBOUT, J.H.W.M.; JOOSTEN, E.P.E.M. 1998. Immunology of fishes. Mucosal immunity. In *Handbook of Vertebrate Immunology* (P. P. Pastoret, P. Griebel, H Bazin & A. Govaerts, eds), pp. 39–40. London: Academic Press.

ROMBOUT, J.H.W.M.; TAVERNE, N.; VAN DE KAMP, M.; TAVERNE-THIELE, A.J. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Developmental and Comparative Immunology**, v.17, p.309–317, 1993.

ROSS, D.A.; WILSON, M.R.; MILLER, N.W.; CLEM, L.W.; WARR, G.W. Evolutionary variation of immunoglobulin m heavy chain RNA processing pathways: origins, effects, and implications. **Immunology Reviews**, v.166, p.143–151, 1998.

ROWLEY, A.F. The evolution of inflammatory mediators. **Mediators of Inflammation**, v.5, p.3-13. 1996.

ROWLEY, A.F.; HUNT, T.C.; PAGE, M.; MAINWARING, G. FISH. IN: ROWLEY, A.F., RATCLIFFE, N.A., editors. Vertebrate blood cells. Cambridge: Cambridge University Press, p. 19-127, 1988.

RYCZYNY, M.A.; WILSON, M.R.; WARR, G.W.; CLEM, L.W.; MILLER, N.W. Membrane immunoglobulin-associated molecules on channel catfish B lymphocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v.20, p.341–351, 1996.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Dietary intake of levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of healthy and aflatoxin-induced immunocompromised rohu, *Labeo rohita*. **Journal of Applied Aquatic**, v.11, p.15–25, 2001.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon Edwardsiella tarda vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.12, p.1–16, 2002.

SAHU, A.; LAMBRIS, J. D. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v.180, p.35–48, 2001.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v.172, p.63–92, 1999.

SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.41, p.66–75, 2010.

SATO, A.; FIGUEROA, F.; MURRAY, B.W.; MÁLAGA-TRILLO, E.; ZALESKA-RUTCZYNSKA, Z.; SÜLTSMANN, H.; TOYOSAWA, S.; WEDEKIND, C.; STECK, N.; KLEIN, J. Nonlinkage of major histocompatibility complex class I and class II loci in bony fishes. **Immunogenetics**, v.51, p.108–116, 2000.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press. p.95–103. 1996.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology** v.19, p.293–306, 2005.

SIWICKI, A.K. Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio*. **Journal of Fish Biology**, v.31, p.245–246, 1987.



SIWICKI, A.K.; KORWIN-KOSSAKOWSKI, M. The influence of levamisole on the growth of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. **Journal of Applied Ichthyology**, v.4, p.178–181, 1988.

SIWICKI, A.K. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). **Developmental and Comparative Immunology**, v.13, p.87–91, 1989.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.41, p.125–139, 1994.

SOLEM, S.T.; STENVIK J. Antibody repertoire development in teleosts—a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. **Developmental and Comparative Immunology**, v.30, p.57–76, 2006.

STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; BELOSEVIC, M. Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p.101–115, 2001.

STAFFORD, J.L.; BELOSEVIC, M. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. **Developmental and Comparative Immunology**, v.27, p.539–554, 2003.

STOSKOPF, M.K. 1993. **Clinical Pathology**. In: Stoskopf, M.K. (Ed.), Fish Medicine. Saunders, Philadelphia, pp. 113–131. 882 pp

STUART, L.M.; EZEKOWITZ, R.A.B. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, v.22, p.539–550, 2005.

SULLIVAN, C.; KIM, C.H. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.341–350, 2008.

SZALAI, A.J.; BLY, J.E.; CLEM, L.W. Changes in serum concentration of channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) phosphorylcholine – reactive protein (PRP) in response to inflammatory agents, low temperature shock and infection by the fungus *Saprolegnia* sp. **Fish and Shellfish Immunology**, v.4, p.323–336, 1994.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R. E; PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitaria. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum**, v.21, p.337–342, 1999.

TIZARD, I.R. 2002. **Imunologia Veterinária**. Uma introdução. São Paulo: Ed. Roca, 532p.

THORARINSSON, R.; POWELL, D.B. Effects of disease risk, vaccine efficacy, and market price on the economics of fish vaccination. **Aquaculture**, v. 256, p. 42-49, 2006

TORROBA, M.; ZAPATA, A.G. Aging of the vertebrate immune system. **Microscopy Research Technology**, v.62, p.477-481, 2003.

VALLEJO, A.N.; ELLIS, A.E. Ultrastructural study of the response of eosinophil granule cells to *Aeromonas salmonicida* extracellular products and histamine liberators in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Developmental and Comparative Immunology**, v.13, p.133-148, 1989.

VAN GINKEL, F.W.; MILLER, N.W.; CUCHENS, M.A.; CLEM, L.W. Activation of channel catfish B cells by membrane immunoglobulin cross-linking. **Developmental and Comparative Immunology**, v.18, p.97-107, 1994.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. 1997. The effect of vitamin C on Fish Health. Roche Technical Bulletin, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland, 30 pp.

VERLHAC, V.; OBACH, J.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.409-424, 1998.

VIEIRA, R.H.S.F. Microbiologia, higiene e qualidade do Pescado. São Paulo: Livraria Varela, p.380. 2003.

VIVAS, J.; CARRACEDO, B.; RIANO, J.; RAZQUIN, B.E.; LOPEZ-FIERRO, P.; ACOSTA, F.; NAHARRO, G.; VILLENA, A.J. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* live vaccine in water microcosms. **Applied Environment Microbiology**, v.70, p.2702-2708, 2004.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marked fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**. v.76, p.165-168, 2002.

WHITE, M.B.; SHEN, A.L.; WORD, C.J.; TUCKER, P.W.; BLATTNER, F.R. Human immunoglobulin D: genomic sequence of the delta heavy chain. **Science**, v.228, p.733-737, 1985.

WILSON, M.; BENGTE'N, E.; MILLER, N.; CLEM, L.W.; DU PASQUIER, L.; WARR, G.W. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.4593–4597, 1997.

WILSON, M.R.; MARCUZ, A.; VAN GINKEL, F.; MILLER, N.W.; CLEM, L.W.; MIDDLETON, D. The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.5227–5233, 1990.

WINKELHAKE, J. L.; CHANG, R. J. Acute phase (C-reactive) protein-like macromolecules from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Developmental and Comparative Immunology**, v.6, p.481–489, 1982.

WITTEN, P.E.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. **Canadian Journal of Zoology**, v.76, p.310–319, 1998.

WOLKE, R. E. Piscine macrophage aggregates: a review. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.91–108, 1992.

WYNNE, J.W.; COOK, M.T.; NOWAK, B.F.; ELLIOTT, N.G. Major histocompatibility polymorphism associated with resistance towards amoebic gill disease in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.22, p.707–717, 2007.

XU, T-J.; CHEN, S-L.; JI, X-S.; TIAN, Y-S. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.213–221, 2008.

YANO, T. Assays of hemolytic complement activity. In STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P. et al. (Ed) **Techniques in Fish Immunology**, vol. 2. U.S.A.: SOS, 1992. p.131–141.

YANO, T. 1996. The nonspecific immune system: Humoral defence. In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment* (G. Iwama, & T. Nakanishi, eds) pp. 105–157. San Diego: Academic Press.

ZHAO, X.; FINDLY, R.C.; DICKERSON, H.W. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish **Developmental and Comparative Immunology**, v.32, p.500–508, 2008.

ZHAO, Y.; KACSKOVICS, I.; PAN, Q.; LIBERLES, D.A.; GELI, J.; DAVIS, S.K. Artiodactyl IgD: the missing link. **Journal of Immunology**, v.169, p.4408–4416, 2002.

ZWOLLO, P.; COLE, S.; BROMAGE, E.; KAATTARI, S. B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. **Journal of Immunology**, v.174, p.6608–6616, 2005.

## **CAPITULO 2 – Respostas imunes inatas e hematológicas de pacu *Piaractus mesopotamicus* após alimentação suplementada com levamisol**

**RESUMO** – Algumas substâncias podem influenciar as respostas do sistema imune de peixes, como o levamisol, anti helmítico sintético que apresenta ação imunoestimulante em peixes, através da modulação de parâmetros imunológicos, aumentando a resistência contra diversos agentes etiológicos. O presente estudo avaliou a administração de levamisol através de dieta suplementada com 0, 125, 250 e 500 mg kg<sup>-1</sup> do imunoestimulante por sete e 15 dias. Após o período experimental, foram avaliados os parâmetros da imunidade (lisozima, atividade bactericida do soro, atividade respiratória de leucócitos), hematológicos (hematócrito, contagens de células vermelhas, concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio dos eritrócitos) e bioquímicos (proteína total, albumina, globulina, índice A:G). A administração do levamisol por sete e 15 dias promoveu alterações em parâmetros imunológicos e hematológicos. A administração de 125 mg kg<sup>-1</sup> do imunoestimulante por 15 dias promoveu aumento da atividade e concentração de lisozima e por sete dias melhorou a atividade respiratória de leucócitos. Já concentração de 500 mg Kg<sup>-1</sup> promoveu aumento do hematócrito e da contagem de eritrócitos. A administração do levamisol pode promover imunomodulação, entretanto a determinação do efeito não ficou claro devido as respostas contraditórias em cada parâmetro avaliado.

**Palavras chaves:** Lisozima, atividade bactericida do soro, atividade respiratória de leucócitos, hemograma, proteínas totais.

**Abstract:** Some substances can influence fish immune system response, such as levamisole, a synthetic drug that presents imunoestimulante action in fish through the modulation of immune parameters, increasing resistance against various etiological agents. This study evaluated the administration of levamisole fed for seven and 15 days. After the trial, immune parameters were evaluated (lysozyme, bactericidal activity, leucocytes respiratory burst), hematological (hematocrit, red blood cell counts, hemoglobin concentration and corpuscular volume of red blood cells) and biochemical (total protein, albumin, globulin and A:G index). The administration of levamisole by seven and 15 days promoted changes in haematological and immunological parameters. The immunostimulant of 1250 mg kg<sup>-1</sup> administration for 15 days increased activity and concentration of lysozyme for seven days promoted improves in leucocytes respiratory burst and. Concentration of 500 mg Kg<sup>-1</sup> promoted increased haematocrit and erythrocyte count. Levamisole administration can promote immune modulation however the determination of the consistent effect is not clear due to the contradictory answers evaluated in each parameter.

**Key words:** Lysozyme, serum bactericidal activity, leucocytes respiratory burst, cell blood contain, total protein.

## 1. Introdução

A intensificação da aquicultura no Brasil cresceu em proporções significantes desde a década de 80, aumentando a produtividade de diversas espécies, porém, este avanço promoveu o aumento de enfermidades, pois os peixes ficam expostos a diversos estressores característicos de manejo, que causam imunossupressão e consequentemente diminuição da resistência contra agentes invasores (Espelid et al., 1996; Vazzana et al., 2002; Davis et al., 2002). As perdas decorrentes de mortes são as maiores preocupações dos produtores (Jah et al. 2007). O uso de quimioterápicos e

antimicrobianos a fim de mitigar os efeitos negativos das enfermidades apresenta impacto negativo no ambiente e nos peixes. Durante a última década, o uso de imunostimulantes visando à prevenção de doenças foi alvo de diversos estudos, principalmente devidos aos resultados benéficos sobre o mecanismo de defesa não específico, melhorando assim, a proteção precoce contra infecções (Sakai, 1999; Sahoo e Mukherjee, 2001; Selvaraj et al., 2005).

Algumas substâncias podem influenciar as respostas do sistema imune de peixes, como o levamisol, antihelmíntico sintético para animais terrestres usado contra parasitos do trato digestório e vias pulmonares (JECFA, 1991). O levamisol foi o primeiro fármaco relacionado com funções de melhora da imunidade celular em animais de laboratório (Renoux, 1980).

O levamisol apresenta ação imunostimulante em peixes através da modulação de parâmetros imunes, como atividade citotóxica de leucócitos, fagocitose, atividade respiratória de leucócitos, aumento de proteínas séricas do sistema complemento e indiretamente a produção de anticorpos (Cuesta et al., 2002), e capacidade de aumentar a resistência contra diversos agentes etiológicos, tais como *Vibrio anguillarum* (Kajita et al., 1990), *Aeromonas hydrophila* (Baba et al., 1993), *Paramoeba* sp. (Findlay et al., 2000; Munday e Zilberg, 2003), *Edwardsiella tarda* (Sahoo e Mukherjee, 2002), *Photobacterium damsela* (Leano et al., 2004) além de nematóides como *Anguillicola crassus* (Geets et al., 1992). Este composto pode ser administrado de forma não invasiva por via oral, através de suplementação da ração, podendo assim, ser considerado uma alternativa ao uso de quimioterápicos e antimicrobianos.

O sistema imune é dividido em inato ou não específico e específico ou adaptativo, ambos constituídos de defesa mediada por células e humorais, que atuam contra microrganismos, toxinas ou células malignas, respondendo frente a fatores exógenos ou endógenos que estimulem os seus componentes. Esses dois sistemas atuam conjuntamente para destruir invasores ou desencadear processos, entretanto o sistema inato está presente e apto antes do aparecimento do invasor, consistindo na primeira barreira de defesa do organismo hospedeiro. Por outro lado, o sistema

específico necessita de prévio estímulo para responder e promover respostas mais efetivas da memória imune (Ellis, 1999; Bayne, 2001).

Os peixes são suscetíveis a agentes virais, bacterianos, fúngicos e parasitários, e apresentam mecanismos capazes de evitar infecção/infestação. Contra a invasão bacteriana, o sistema inato apresenta diversos compostos antibacterianos, tais como as proteínas de fase aguda da inflamação, ação do complemento ativado pela via alternativa, citocinas, fagocitose e consequentemente a inflamação (Ellis, 2001). Entre os componentes humorais inatos, há os fatores inibidores do crescimento de bactérias, como a transferrina, antiproteases, lisozima, proteína C reativa, peptídeos antibacterianos e as proteínas do sistema complemento ativadas pela via alternativa. Entre as células de defesa, os fagócitos, representados pelos neutrófilos e macrófagos, são muito importantes por apresentarem grandes quantidades de enzimas em lisossomos, além de, na presença de bactérias, produzirem espécies reativas de oxigênio que são responsáveis pela destruição destes microrganismos. Assim o agente etiológico bacteriano necessita ultrapassar estas barreiras para estabelecer um processo infeccioso (Ellis, 1999).

O pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characida: Myleinae) possui importantes características zootécnicas e é uma espécie de destaque na piscicultura nacional (Oliveira et al., 2004; Queiroz et al., 2005). Atualmente a produção do pacu no Brasil está em torno de 12.000 ton ao ano e apresenta tendências de crescimento (FAO, 2008). Entretanto, são escassos os estudos sobre o uso de imunostimulante e principalmente sobre as respostas do sistema imune inato desta espécie (Abreu et al., 2009; Belo et al., 2005; Garcia et al., 2007). Assim, diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do levamisol administrado por sete e 15 dias nas respostas imunes inatas, hematológicas e bioquímicas de pacus. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética (protocolo número 004206/10).



## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Acondicionamento e manejo dos peixes**

O experimento foi realizado no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal. Foram utilizadas 24 caixas de polietileno com capacidade para 100 litros, dispostas em sistema de circulação aberta, com renovação contínua de água proveniente de poço artesiano com temperatura constante (aproximadamente 29°C). Foram utilizados 240 exemplares jovens de pacu, com peso médio de  $200,6 \pm 42,28$  g e comprimento total  $21,07 \pm 1,41$  cm que após o período de aclimação e jejum de 24 horas, foram capturados aleatoriamente, anestesiados com solução alcoólica de benzocaína ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ), pesados, medidos e distribuídos na proporção de dez peixes por caixa.

### **2.2. Delineamento experimental**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com oito tratamentos ( $2 \times 4$ ), correspondendo aos dois tempo de administração (sete e 15 dias) e aos quatro níveis de inclusão de levamisol na ração (0, 125, 250 e  $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ), com seis repetições por tratamento. Os peixes foram mantidos nas caixas por 20 dias para aclimação e após este período, os peixes de todos os tratamentos receberam suas respectivas rações.

### **2.3. Ração experimental e período de administração**

O levamisol foi incorporado à ração através da moagem e peletização de ração comercial (28% PB, e  $3.000 \text{ kcal ED kg}^{-1}$  de ração) com as respectivas concentrações para cada tratamento. Durante a fase de aclimação e período experimental, os peixes

foram alimentados até a saciedade aparente, em duas refeições diárias, às 9 e 17 horas.

## **2.4. Amostragem**

Após sete e 15 dias de alimentação com as rações experimentais, dois peixes de cada caixa que compõem os tratamentos (12 peixes por tratamento) foram anestesiados (solução alcoólica de benzocaína,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) e foi realizada a colheita de sangue por punção do vaso caudal seguido de biometria e posteriores análises imunológicas, hematológicas e bioquímicas. Após este procedimento os peixes coletados foram descartados.

## **2.5. Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e bioquímicos**

Para a coleta de sangue, seringas sem anticoagulante foram utilizadas e o sangue destinado a obtenção de soro e análise da atividade bactericida, lisozima, proteína total e albumina. Para a obtenção de sangue total, microtubos com anticoagulante (heparina) foram utilizados para armazenamento de sangue que foi destinado a determinação da atividade respiratória de leucócitos, hemograma completo com determinação do hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio dos eritrócitos.

### **2.5.1. Parâmetros Imunológicos**

#### **2.5.1.1. Atividade bactericida do soro**

A avaliação da atividade bactericida do soro dos pacus seguiu a metodologia preconizada por Kajita et al. (1990), Rao et al. (2006), Aly et al. (2008), com a

introdução de algumas modificações. Inicialmente uma cepa de *Aeromonas hydrophila*, pertencente ao acervo bacteriano do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA-CAUNESP-Jaboticabal), previamente caracterizada, por testes bioquímicos adequados (Bergey e Holt, 1994), foi semeada em caldo TSB, e incubada a 30° C por 24 horas. Após este período, a suspensão bacteriana foi lavada e centrifugada (centrífuga refrigerada a 3000 g por 3 min) em tampão fosfato estéril (PBS, composto por NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,9 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,49 mM, em água destilada Milli-Q qsp 1 litro) com pH 7,4. A suspensão bacteriana foi diluída em tampão PBS estéril na concentração de 1x10<sup>8</sup> UFC (escala de Mc Farland) (Vandepitte et al., 1993).

A fim de avaliar a atividade bactericida do soro, foram incubados em microtubos estéreis 40 µL da suspensão de *A. hydrophila* e 40 µL de soro de pacu por 1 hora a 37°C. Após este procedimento, uma alíquota deste homogenizado foi depositada em placas de Petri. O meio de cultura utilizado foi triptona de soja (TSA) e o método de plaqueamento foi o “pour plate”. As culturas foram incubadas por 24 horas a 30°C. O grupo positivo consistiu de placas contendo bactérias em suspensão e tampão PBS no lugar do soro. Após o período de crescimento, o número de colônias foi quantificado em contador de colônia manual e os valores expressos em porcentagem nos grupos tratados em relação ao grupo positivo.

#### **2.5.1.2. Análise da concentração e atividade de lisozima**

A determinação da concentração e atividade de lisozima foi baseada no método clássico de lisar uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* e foi medida por meio da redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (Smolelis e Hartsell, 1949). A lisozima tem capacidade de atuar sobre ligações beta 1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico de membranas de parede celular bacterianas, levando a sua lise e conseqüente destruição

do patógeno (Paulsen et al., 2003). A análise foi realizada por ensaio turbidimético, segundo Parry (1965) com adaptações.

A partir da curva padrão, determinada utilizando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha, foi quantificada e as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta. Após a determinação de curva de calibração, o soro de peixes de todos os tratamentos, inicialmente, passaram por tratamento térmico (banho a 56°C por 30 min) para inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo, assim, que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* fosse provocada exclusivamente por ação da lisozima. Assim, 50 µL soro de pacu (em triplicata) foram depositados em microplacas, de acrílico estéril de 96 cavidades, em 50 µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2), após homogenização, o soro foi submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2, mantendo um volume final de 50 µL por cavidade. Em cada cavidade foram depositados 125 µL de suspensão de *M. lysodeikticus* (0,2% em tampão fosfato de sódio). A redução da densidade óptica, em 450 nm, foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 30°C. Os resultados em concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  de amostra) foram obtidos a partir da redução da  $\delta$  DO para cada volume de amostra avaliada, e os resultados em unidade de atividade ( $\text{U mL}^{-1}$ ) foi determinada como a quantidade de enzima que produziu, em 450 nm, um  $\delta$  DO de  $0,001 \text{ min}^{-1}$  (Won et al. 2004).

#### **2.5.1.3. Atividade respiratória de leucócitos**

A análise da atividade respiratória de leucócitos seguiu o protocolo de Anderson e Siwicki (1995) e Sahoo et al. (2005). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante “*nitroblue tetrazolium*” (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (Klein, 1990). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25°C. Após incubação,

50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de *formazan* liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

## **2.5.2. Parâmetros Bioquímicos**

### **2.5.2.1. Proteína total, albumina, globulina sérica e índice A:G**

A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método do Biureto (Kit Labtest) e a de albumina foi determinada pelo método colorimétrico – verde de bromocresol (Kit Labtest). A globulina foi determinada subtraindo a albumina da proteína total e o índice albumina-globulina (A:G) foi calculado dividindo-se o valor da fração albumina pelo valor total da fração globulina de cada amostra analisada.

## **2.5.3. Parâmetros Hematológicos**

### **2.5.3.1. Hematócrito, números de eritrócitos, hemoglobina e volume corpuscular médio**

No sangue total heparinizado foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos (NE), concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio dos eritrócitos (VCM) (Contador de Células Celm CC550).

## **2.6. Monitoramento da qualidade de água**

A água das caixas foi coletada duas vezes por semana para determinação da temperatura, potencial hidrogeniônico com pHmetro (Corning), oxigênio dissolvido com oxímetro (YSI 55) e amônia total pelo método do reagente de Nessler. Os parâmetros avaliados permaneceram dentro de faixas consideradas adequadas para peixes tropicais, de acordo com Proença e Bittencourt (1994) com temperatura média de 28°C, pH  $7,85 \pm 0,18$ , O<sub>2</sub> dissolvido  $5,98 \pm 0,97 \text{ mg L}^{-1}$  e NH<sub>4</sub>  $0,24 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$ .

## **2.7. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) através do programa estatístico SAS (9.2).

## **3. Resultados**

### **3.1. Parâmetros Imunológicos**

#### **Atividade bactericida do soro**

O resultado do ensaio da atividade bactericida do soro deu-se pela contagem das UFCs e posterior cálculo da porcentagem que o valor representava quando comparado com o grupo positivo, que apresentou resposta considerada 100% (Figura 1). Os grupos controle e tratados apresentaram capacidade de destruir bactérias, quando comparados com o grupo positivo, entretanto a administração do imunoestimulante por sete ou 15 dias, em suas diversas concentrações, não promoveu diferenças significativas. Houve um perfil de maior atividade nos três grupos tratados com levamisol, mas sem significado estatístico.

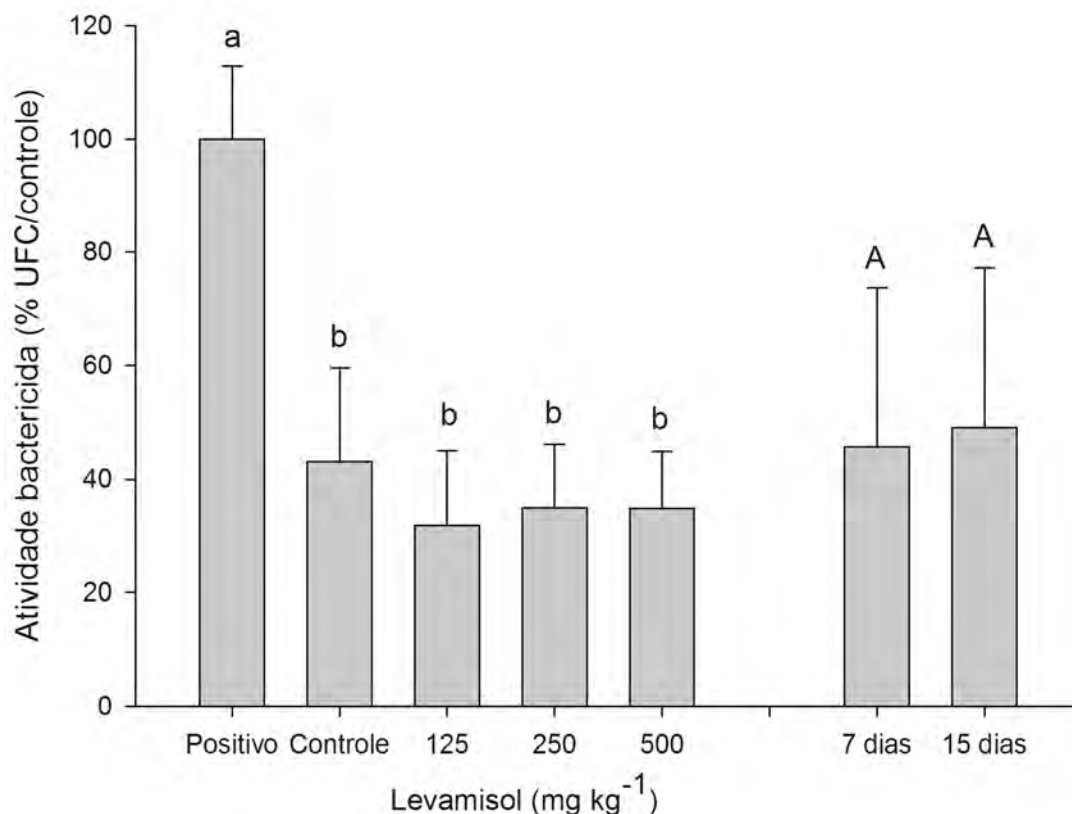
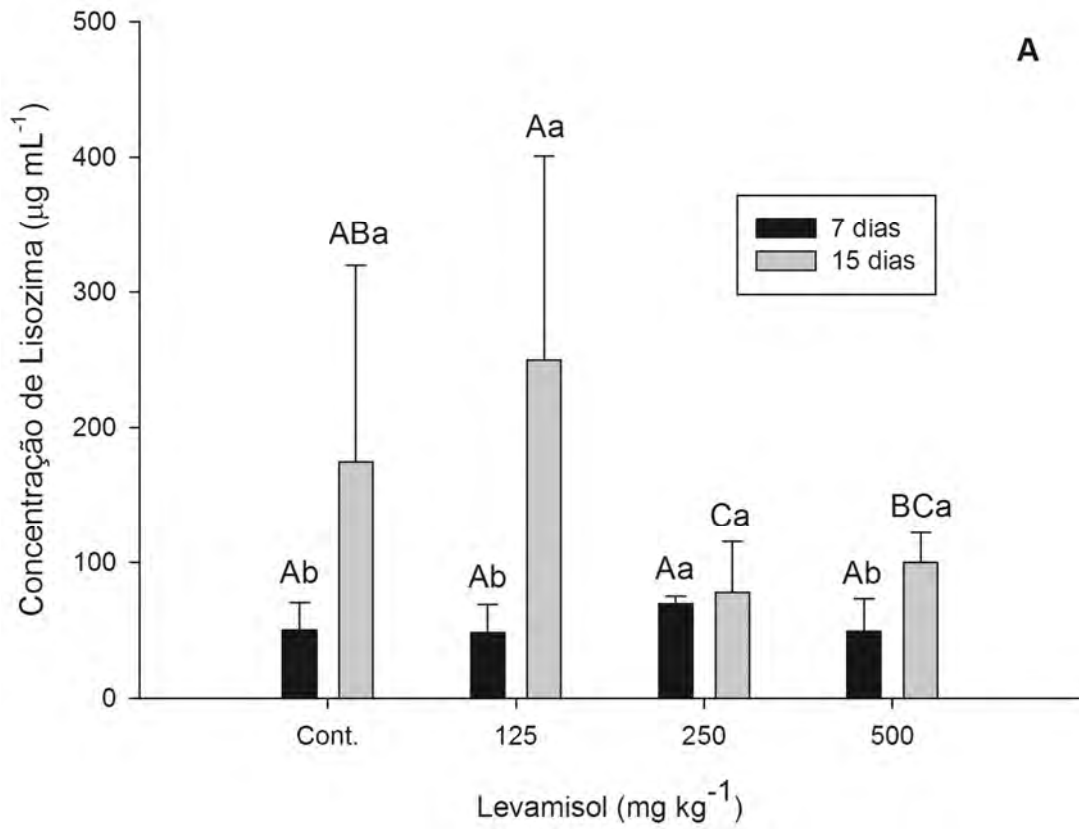


Figura 1. Atividade bactericida do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Letras diferentes minúsculas indicam diferença significativa entre concentrações e maiúsculas entre período de administração pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### Concentração e atividade de lisozima

A concentração e atividade de lisozima, enzima lítica de grande importância na defesa contra patógenos, é apresentada na Figura 2 (A e B). Ambos os parâmetros apresentaram valores mais elevados após administração do levamisol por 15 dias, exceto no grupo alimentado com 250 mg kg<sup>-1</sup>. A concentração do imunestimulante não influenciou os peixes tratados por sete dias, contudo os peixes alimentados por 15 dias tiveram aumentos da concentração e atividade da lisozima nos grupos controle e

alimentados com  $125 \text{ mg kg}^{-1}$ , sendo o último superior aos tratados com 250 e 500  $\text{mg kg}^{-1}$  e o controle maior que 250  $\text{mg kg}^{-1}$





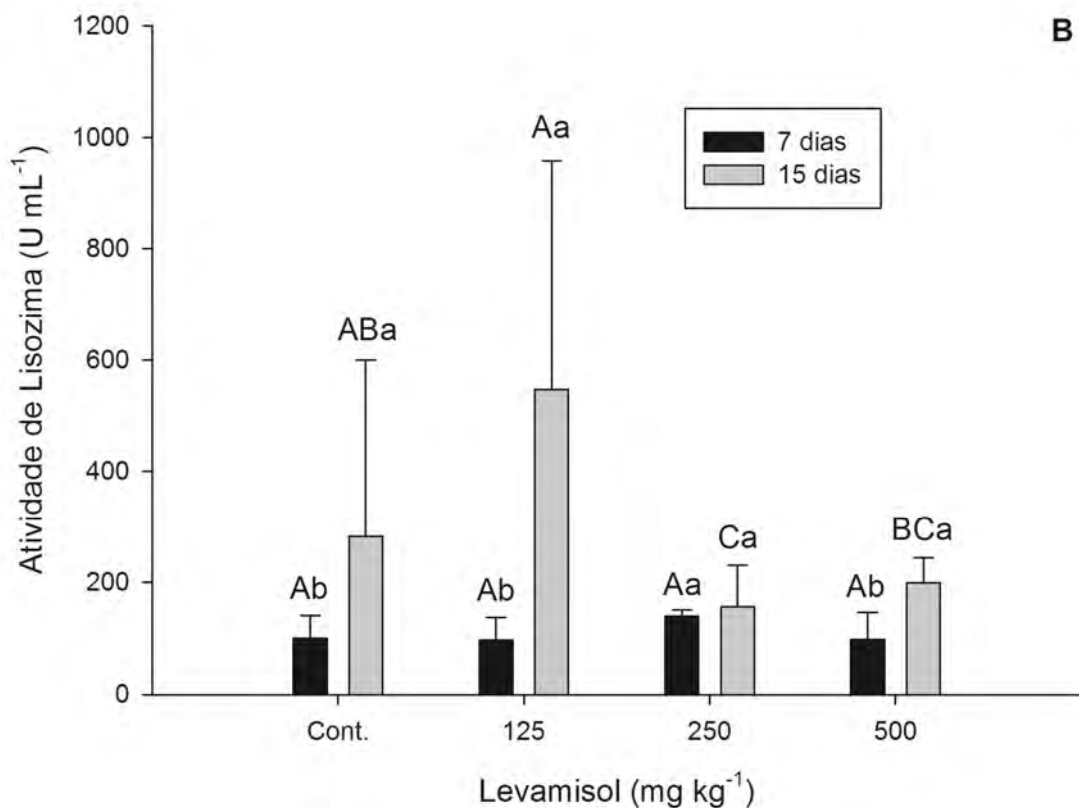


Figura 2. Concentração (A) e atividade (B) de lisozima do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Letras diferentes maiúsculas indicam diferença significativa entre concentrações e minúsculas entre período de administração pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### Atividade respiratória de leucócitos

A atividade respiratória de leucócitos, que indica a produção de espécies reativas de oxigênio, apresentou-se elevada nos peixes alimentados com levamisol por sete dias em comparação aos peixes alimentados por 15 dias (Figura 3), mas não foi influenciada pela concentração de levamisol na ração.

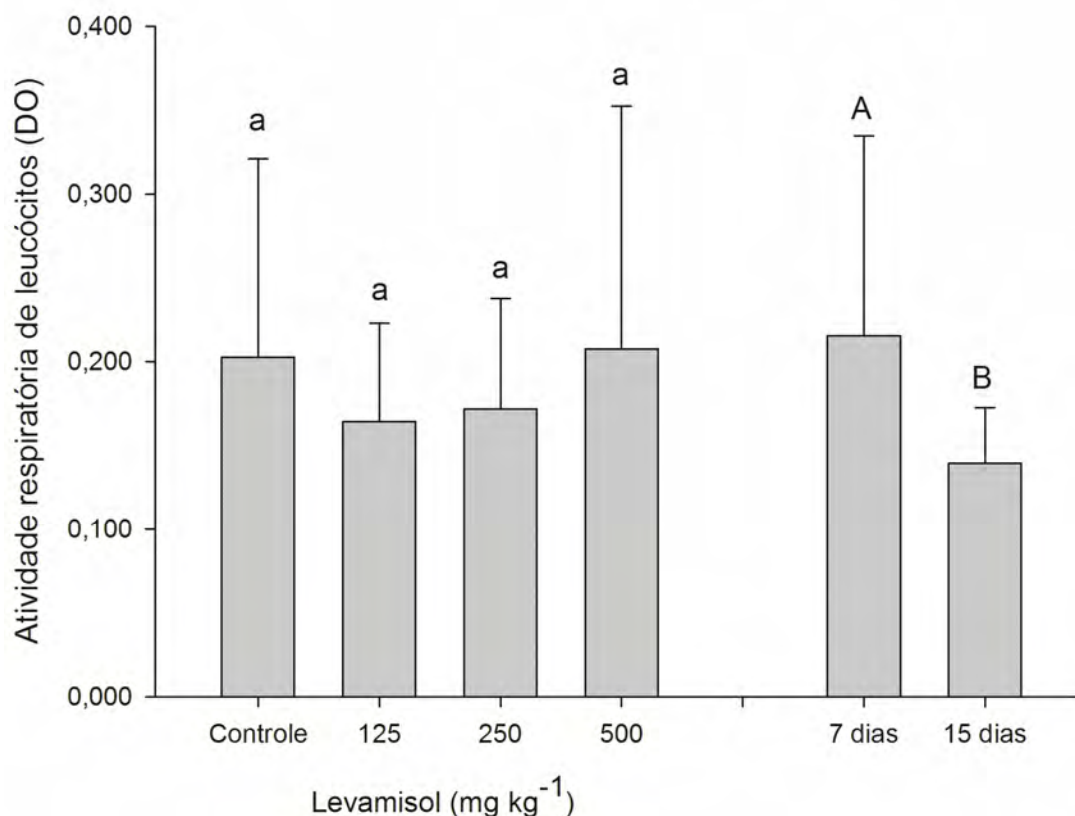


Figura 3. Atividade respiratória de leucócitos do sangue de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Letras diferentes minúsculas indicam diferença significativa entre concentrações e maiúsculas entre período de administração pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. Parâmetros Bioquímicos

#### Proteína total, albumina, globulina sérica e índice A:G

Os valores obtidos de proteína total (Figura 4), albumina (Figura 5), globulina sérica (Figura 6) e índice A:G (Figura 7) não apresentaram diferença estatística entre os grupos tratados com levamisol e o controle, indicando que tanto as concentrações como os períodos de administração de levamisol não influenciaram a produção das proteínas séricas.

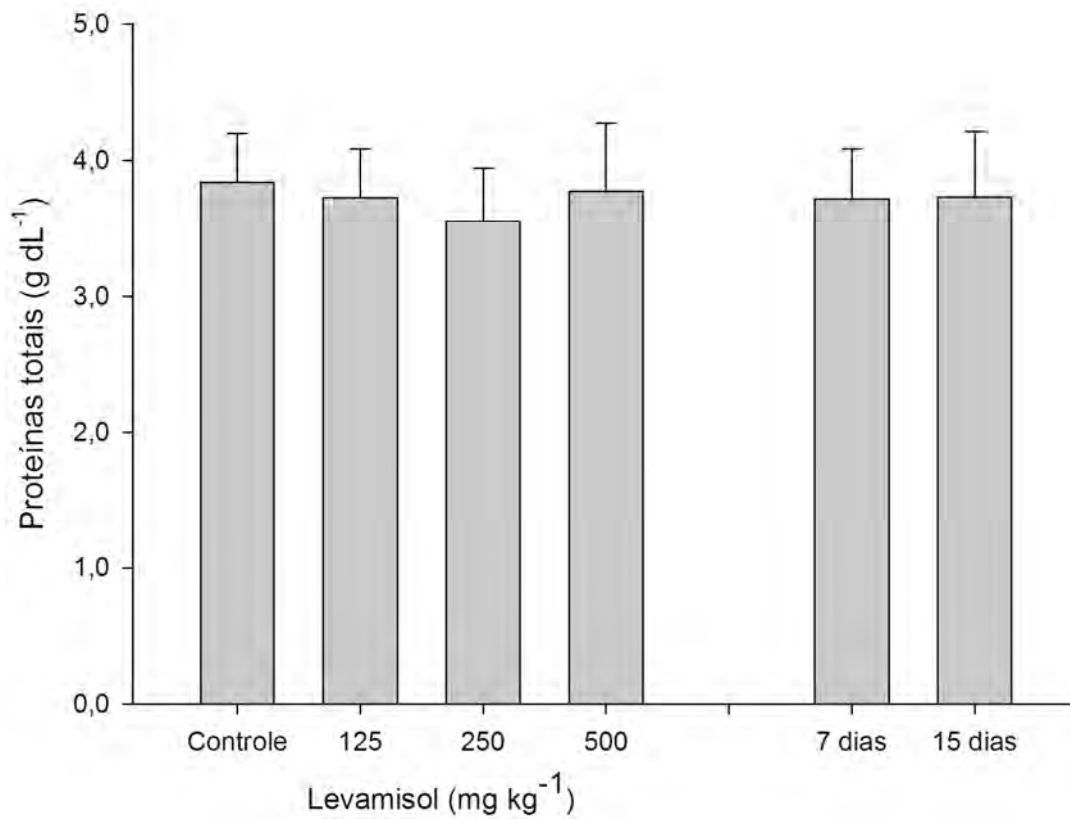


Figura 4. Concentração de proteínas totais do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

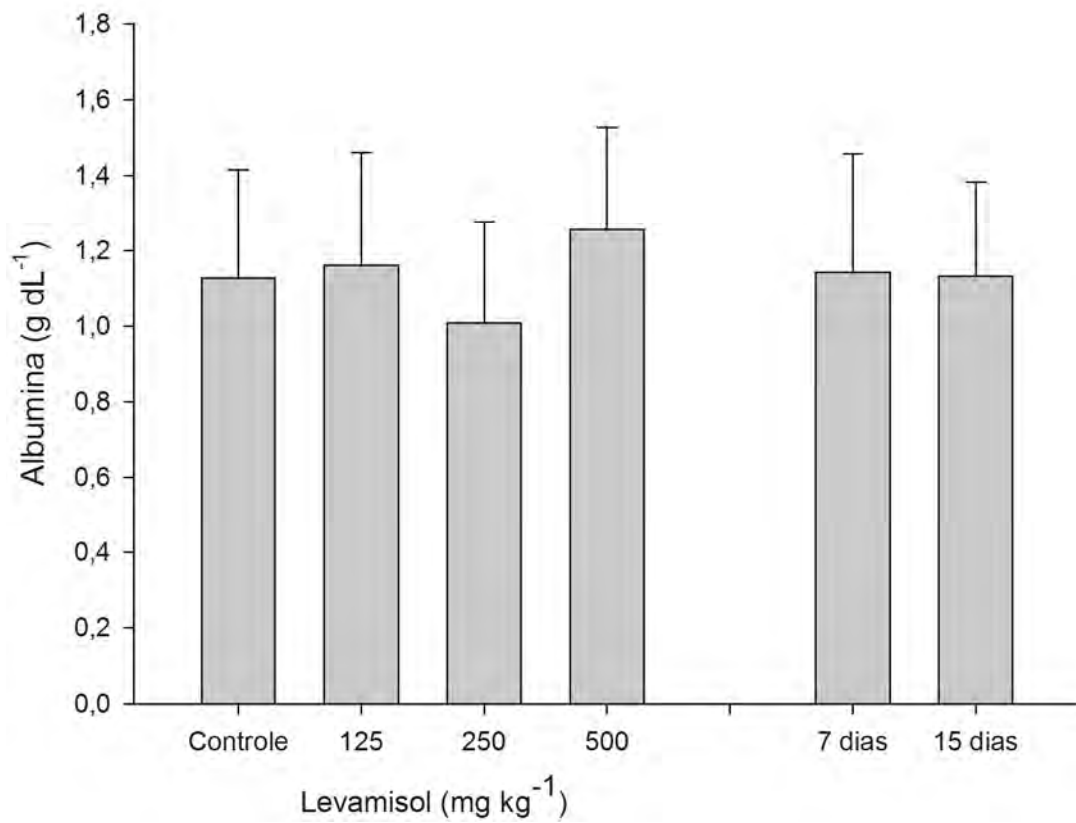


Figura 5. Concentração de albumina do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

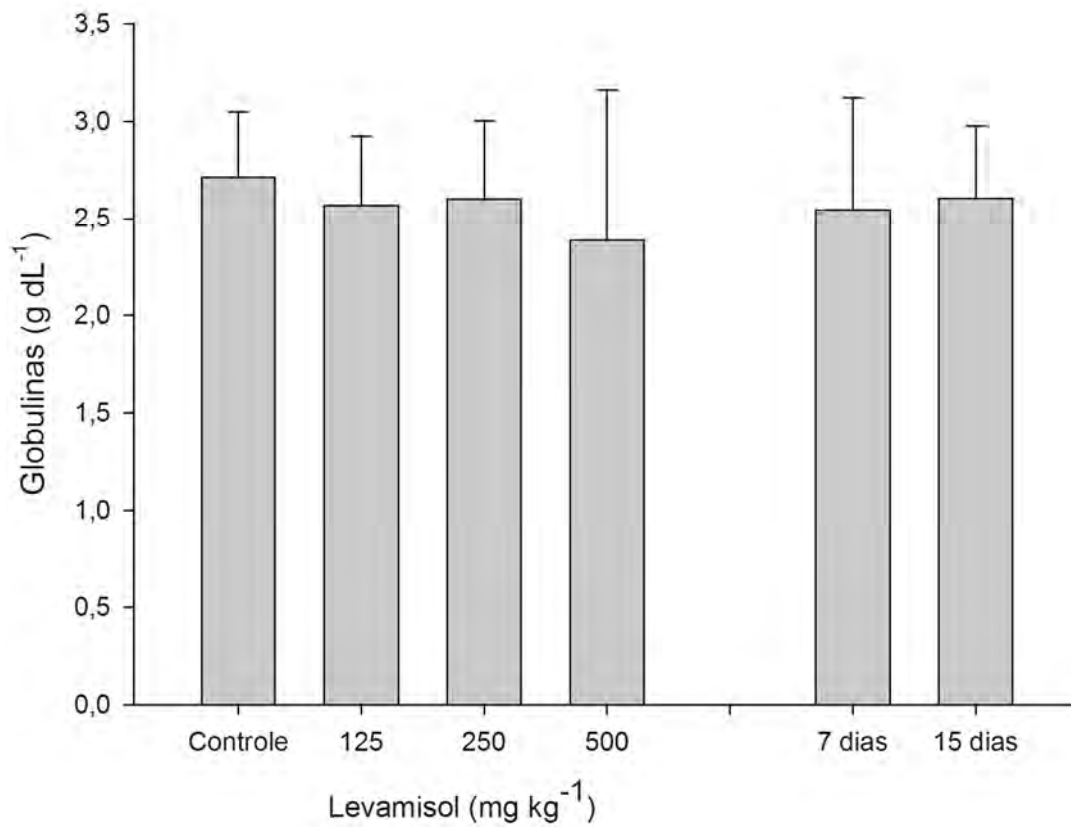


Figura 6. Concentração de globulina do soro de pacus (média ± desvio padrão) alimentados com levamisol. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

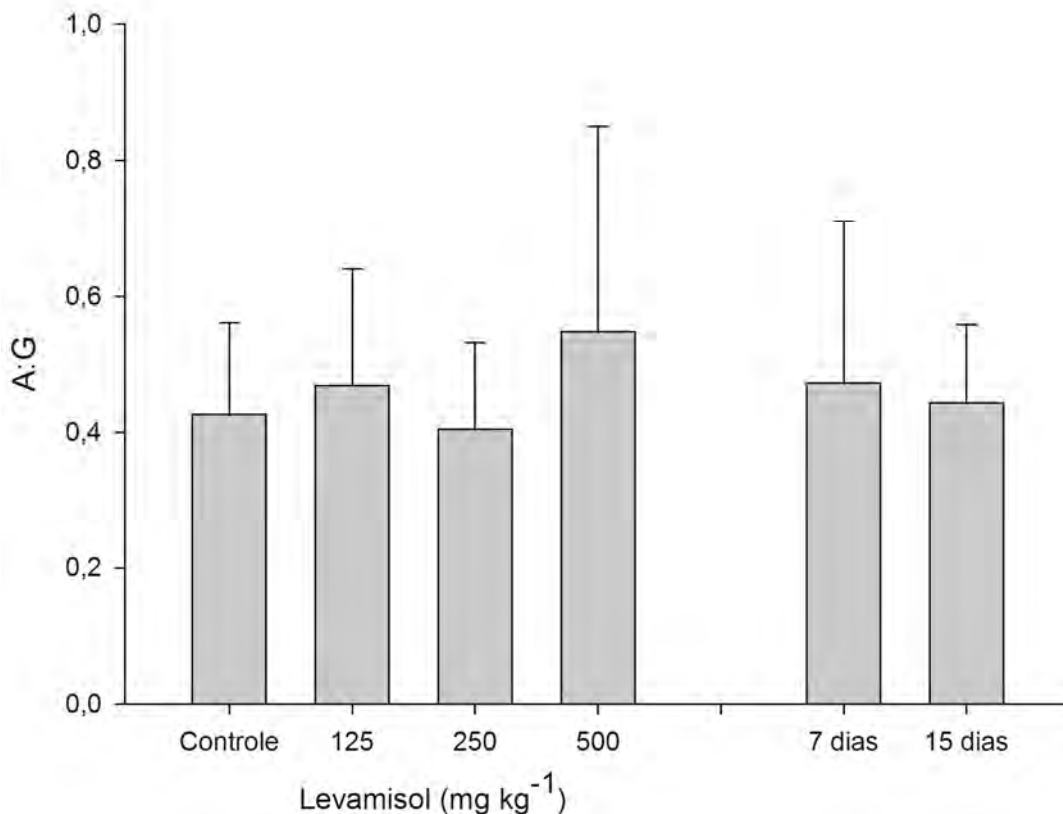


Figura 7. Índice albumina-globulina (A:G) do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Parâmetros hematológicos (Hematócrito, número de eritrócitos, hemoglobina e volume corpuscular médio)

As respostas hematológicas dos peixes alimentados com levamisol por sete ou 15 dias, tais como hematócrito (Figura 8) e número de eritrócitos (Figura 9) foram influenciadas pela concentração do imunoestimulante. Os peixes alimentados com 500 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol apresentaram maiores valores de hematócrito quando comparados com os grupos tratados, enquanto que os valores de número de eritrócitos dos peixes que receberam 500 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol foram maiores em comparação ao grupo tratado com 250 mg kg<sup>-1</sup>. Já a concentração de hemoglobina (Figura 10) apresentou-se elevada após administração de levamisol por 15 dias, entretanto não

sofreu influência das concentrações do imunoestimulante. Em relação ao volume corpuscular médio (Figura 11), os peixes alimentados por sete dias apresentaram maiores valores quando comparados com os alimentados por 15 dias, contudo não foram influenciados pela concentração do levamisol administrado.

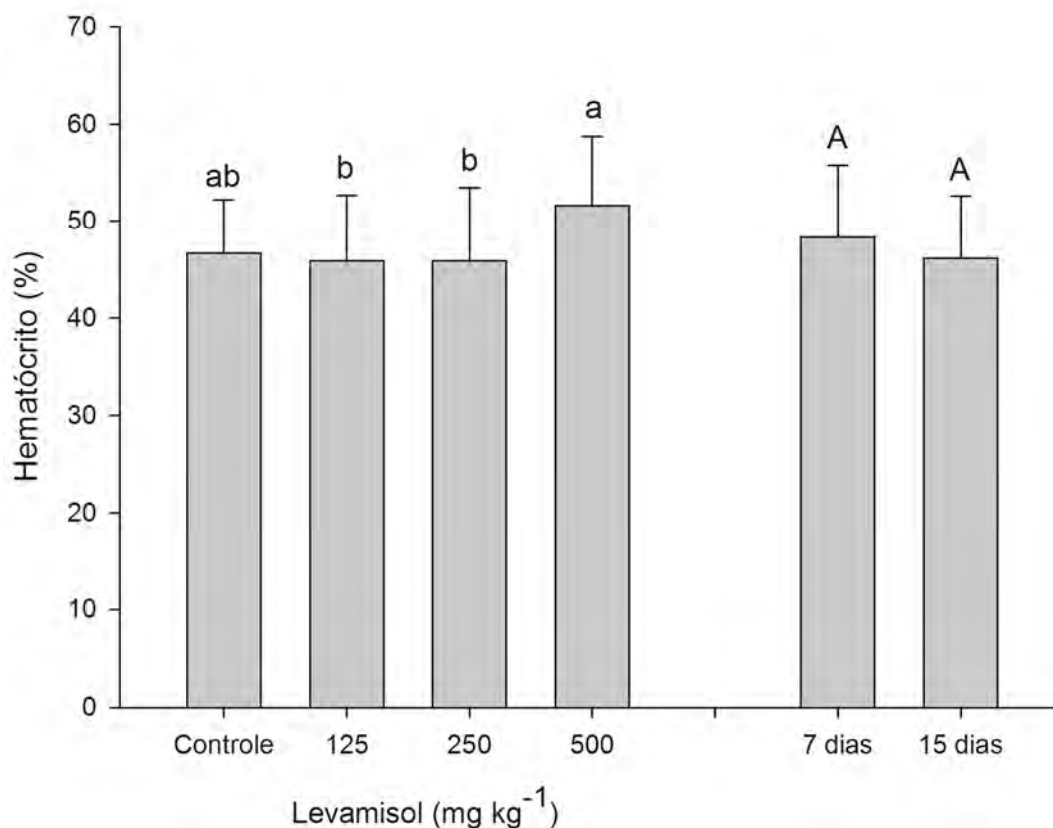


Figura 8. Hematócrito do sangue de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Letras diferentes minúsculas indicam diferença significativa entre concentrações e maiúsculas entre período de administração pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

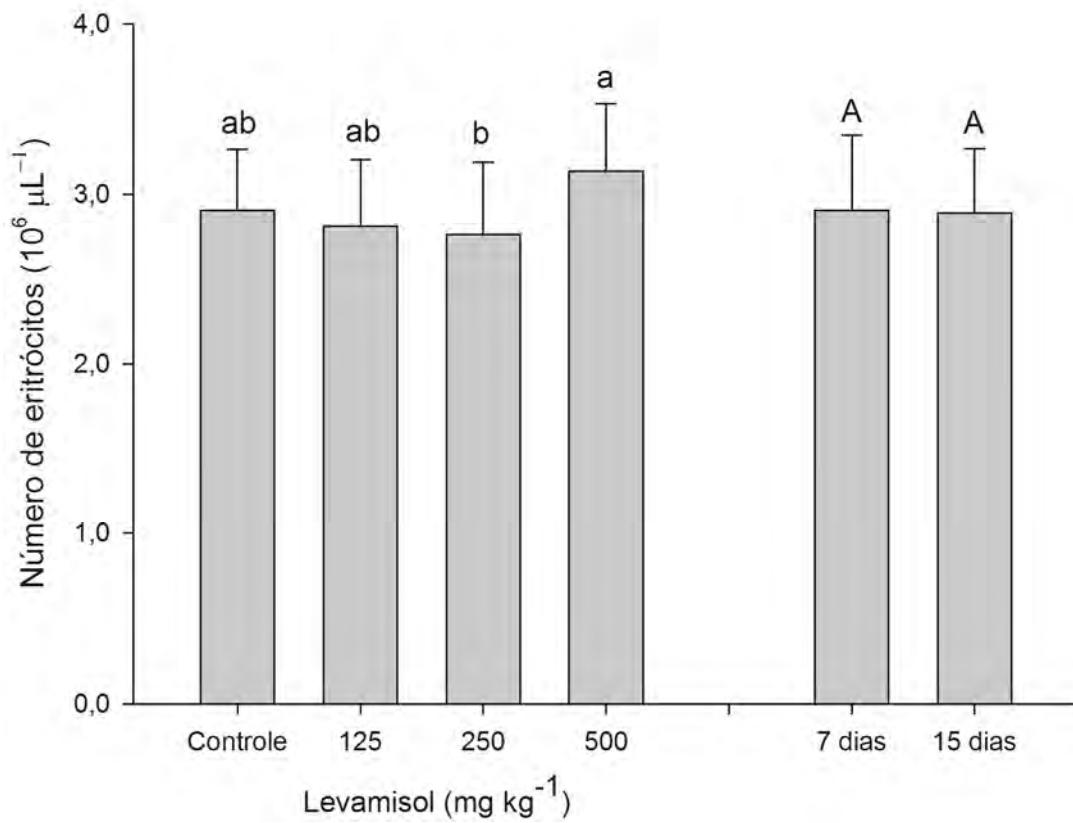


Figura 9. Número de eritrócitos do sangue de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Letras diferentes minúsculas indicam diferença significativa entre concentrações e maiúsculas entre período de administração pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



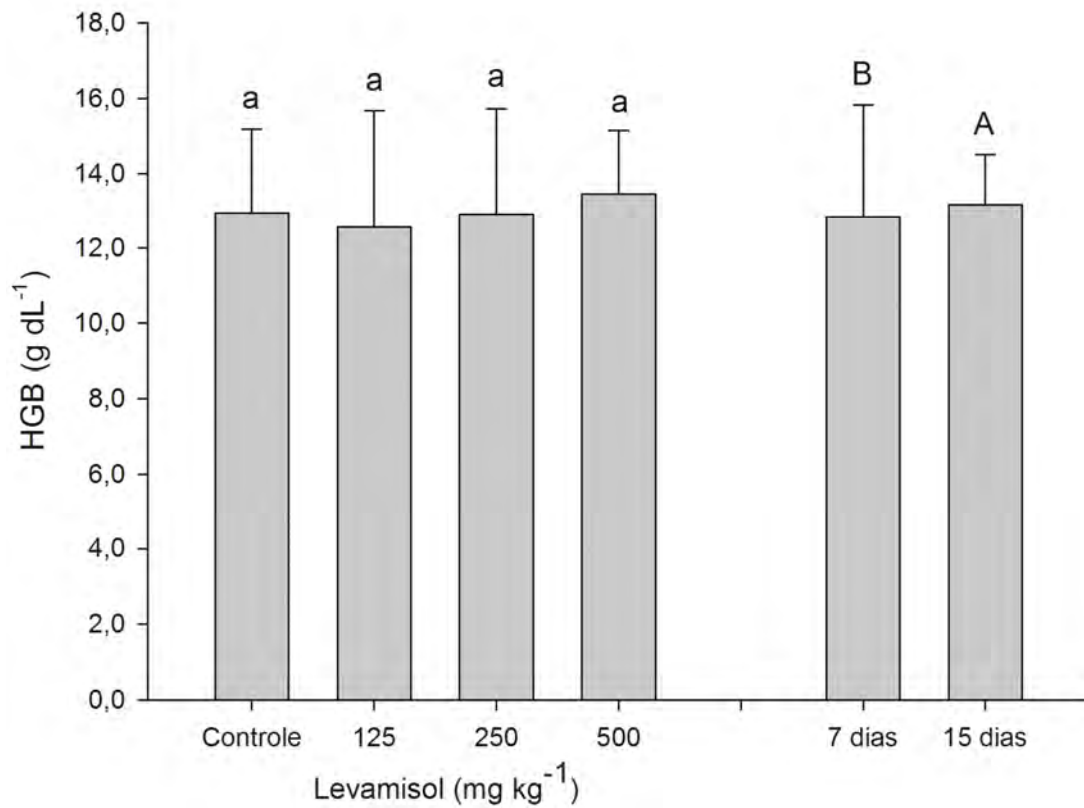


Figura 10. Concentração de hemoglobina (HGB) do sangue de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Letras diferentes minúsculas indicam diferença significativa entre concentrações e maiúsculas entre período de administração pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

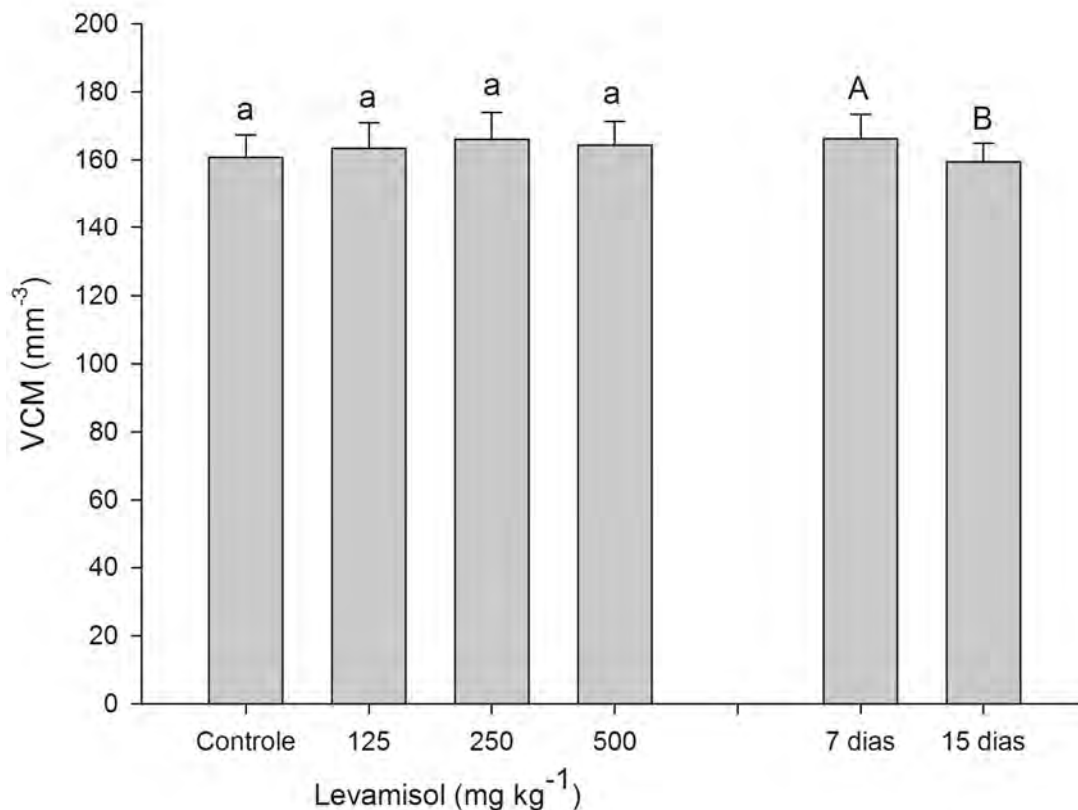


Figura 11. Volume corpuscular dos eritrócitos de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol. Letras diferentes minúsculas indicam diferença significativa entre concentrações e maiúsculas entre período de administração pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

A administração de levamisol em pacus, por sete e 15 dias, alterou alguns parâmetros hematológicos e teve ação moderada sobre alguns indicadores do sistema imune inato. O levamisol estimula a produção de componentes do sistema de defesa melhorando as chances dos peixes sobreviverem aos desafios impostos pela criação intensiva (Alexander e Ingram, 1992). O mecanismo de ação do levamisol não está bem

estabelecido, entretanto alguns estudos demonstram que este imunoestimulante atua positivamente sobre parâmetros inatos e indiretamente sobre os adquiridos, em diferentes espécies de peixes.

O soro de peixes de todos os tratamentos apresentou capacidade de destruir o crescimento da bactéria *A. hydrophila*. Entretanto, o levamisol não potencializou a atividade bactericida do soro na presença da bactéria, pois os peixes tratados não demonstraram diferenças significativas quando comparados com os peixes controle, embora fosse possível observar menor contagem de bactérias no soro dos peixes tratados com o imunoestimulante. A atividade bactericida do soro indica a capacidade de componentes séricos atuarem na destruição de bactérias, uma vez que a via alternativa do sistema complemento é ativada por componentes de parede de bactérias, contribuindo para sua destruição juntamente com as demais proteínas séricas (Bradley, 1979). Resultados semelhantes foram observados por Kajita et al. (1990) e Mulero et al. (1998) em *Oncorhynchus mykiss* e *Sparus auratus* L., respectivamente. Entretanto, Misra et al. (2009) encontraram efeitos benéficos do levamisol em *Labeo rohita* alimentados por 56 dias com as mesmas dosagens do imunoestimulante do presente estudo. Os autores amostraram os peixes aos 15, 28, 42 e 56 dias, e observaram resposta do imunoestimulante a partir do 15º dia, sendo que os melhores resultados foram apresentados após 28 e 42 dias de administração. O tempo de administração utilizado foi, aparentemente, insuficiente para a expressão do efeito do imunoestimulante no pacu.

No caso da determinação da concentração e atividade da lisozima, o levamisol aumentou significativamente estes parâmetros, principalmente nos peixes alimentados com 125 mg kg<sup>-1</sup> quando os peixes foram alimentados por 15 dias, entretanto esta resposta não diferiu da resposta do grupo controle, que foi em torno de 30,02% mais reduzida, provavelmente pela alta variabilidade encontrada nos dados obtidos. A lisozima atua principalmente sobre a parede de bactérias gram-positivas e algumas gram-negativas juntamente com o sistema complemento, atuando na proteção do organismo hospedeiro (Alexander e Ingram, 1992). Diferentemente deste estudo, Misra et al. (2009) observaram em *L. rohita* alimentadas com 250 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol

aumento da lisozima após 28 dias de administração. Resultados semelhantes foram relatados por Gopalakannan e Arul (2006) em *Cyprinus carpio* alimentadas por 30 dias com 250 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol. Por outro lado, o levamisol administrado por 10 dias em *Clarias batrachus* não promoveu diferenças significativas nos níveis de lisozima, promovendo ainda diminuição nos maiores níveis após três semanas (Sahoo e Kumari, 2006), resultados que reforçam que o tempo de administração do levamisol no pacu pode ter afetado as respostas ao imunoestimulante.

Outro benefício do uso de imunoestimulantes no sistema imune pode ser observado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por leucócitos de peixes. As EROs apresentam capacidade de destruir invasores e proteger o organismo contra possíveis infecções, assim o aumento deste parâmetro pode ser um indicador de aumento da resistência e melhora do sistema imune. Não foi possível observar efeito do levamisol na atividade respiratória do pacu. Ocorreu aumento desta atividade na amostragem de 15 dias em relação aos dados obtidos aos sete dias, independente da concentração de levamisol. Resultados diferentes foram descritos por Sahoo e Kumari (2006) em *C. batrachus*. A suplementação com 50 mg kg<sup>-1</sup> aumentou a produção de radicais oxidativos e a concentração sérica de mieloperoxidase após 10 dias de alimentação, com pico nas respostas após três e duas semanas respectivamente.

As proteínas séricas são importantes para a manutenção da pressão oncótica, essencial para a homeostase dos fluidos corpóreos, bem como carreador de compostos. Os dois maiores grupos de proteínas são as albuminas e as globulinas (Schell e Blumberg, 1977). Globulinas são proteínas presentes no soro, entre as quais estão as imunoglobulinas, e outros componentes responsáveis pela defesa do organismo. Em alguns casos, diminuições das concentrações destas proteínas indicam saúde debilitada e subnutrição (Maqsood et al., 2009).

A albumina é a mais abundante das proteínas séricas, e neste trabalho não houve alterações de sua concentração. Misra et al. (2009) observaram em *Labeo rohita*, alimentadas por 56 dias com levamisol, aumento das concentrações de albumina a partir de 15 dias de alimentação, bem como Maqsood et al. (2009) em *Cyprinus carpio*

alimentados por 57 e 70 dias com o imunoestimulante. Resultados semelhantes foram observados após administração de outros imunoestimulantes, tais como  $\alpha$ -tocoferol (Sahoo e Mukherjee, 2002) e levana (Dina Rairakhwada et al., 2007).

A administração por sete ou 15 dias do imunoestimulante não promoveu alterações significativas na concentração total de proteínas, globulinas e o índice A:G. Aumento das concentrações de proteína total e globulinas foi relatado em carpas alimentadas com 250 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol por 57 e 70 dias, bem como melhora do índice A:G após administração de 250 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol por 70 dias (Maqsood et al., 2009). Adicionalmente, Misra et al. (2009) observaram em *Labeo rohita*, alimentados por 56 dias com o imunoestimulante, aumento das concentrações de proteínas totais séricas a partir dos 15º dia de administração e das globulinas a partir do 28º dia, entretanto não observaram melhora no índice A:G. Em pacus alimentados com 50, 100, 200, 400 e 800 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol, Sado et al. (2010) observaram aumento das proteínas totais após 45 dias de administração de levamisol, entretanto sem influência das concentrações administradas.

Os níveis de proteínas totais no soro são atribuídos aos diferentes componentes protéicos, como as globulinas, bem como a lisozima, complemento, e outros peptídeos (Alexander e Ingram 1992; Misra et al., 2009). A atividade bactericida do soro está relacionada com proteínas protetoras que podem apresentar-se aumentadas após administração de levamisol (Siwicki et al., 1994). Assim, o fato do imunoestimulante não ter promovido aumento de proteínas totais, isso pode ser relacionado à ausência de alteração significativa na atividade bactericida do pacu.

O sangue de peixes teleósteos é formado de eritrócitos e por células de defesa. Os eritrócitos e a hemoglobina, seu principal componente, são responsáveis pelas trocas gasosas no organismo. A análise dos parâmetros hematimétricos de peixes, compostos por hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio indica resposta para a demanda energética em situações adversas, bem como o estado imune. Entretanto há poucos estudos que avaliam os efeitos do levamisol sobre estes parâmetros nas diversas espécies (Cuesta et al. 2002, 2004; Ispir e Dorucu, 2005, Li et al. 2006a; Sado et al., 2010).

O hematócrito é a avaliação percentual da quantidade de células presentes no sangue, incluindo células vermelhas e brancas de defesa. Os estudos sobre os efeitos do levamisol sobre o hematócrito de peixes indicam que este parâmetro pode apresentar-se aumentado devido à ação do imunoestimulante sobre a proliferação de células de defesa, principalmente linfócitos T (Renoux, 1980). O hematócrito e o número de eritrócitos apresentaram aumento significativo na concentração de 500 mg kg<sup>-1</sup> independente do período de administração. Diversos pesquisadores observaram resultados diferentes, tais como Li et al., (2006) em robalos híbridos, Sahoo e Mukherjee, (2001) em *Labeo rohita* e Ispir e Dorucu, (2005), em trutas arco-íris e Sado et al. (2010) em pacus, nos quais a administração de levamisol não influenciou no hematócrito.

A hemoglobina e volume corpuscular médio são variáveis que avaliam as resposta do organismo à demanda energética e podem variar de acordo com diversos fatores, tais como idade, sexo época do ano e condição de saúde (Post, 1987; Ranzani-Paiva, 2004). Pacus alimentados por sete dias, independente da concentração do imunoestimulante, apresentaram diminuição da hemoglobina e aumento do VCM, evidenciando que o organismo produziu e liberou para circulação grande quantidade de eritrócitos jovens, caracterizados por serem maiores e apresentarem menor concentração de hemoglobina. Por outro lado, após a administração por 15 dias de levamisol, o efeito foi contrário, com aumento da concentração de hemoglobina e diminuição do VCM. Sado et al. (2010) observaram em pacus diminuição da hemoglobina, sem alteração de VCM, após administração de levamisol por 30 dias.

Os resultados encontrados neste trabalho não comprovam os benefícios do levamisol descritos na literatura para diversas espécies de peixes. Fatores como tempo e via de administração são importantes na definição da eficiência e efeitos sobre as respostas dos organismos (Sakai, 1999). Diferentes vias de administração, tais como banho de imersão e injeção intramuscular do levamisol também apresentaram resultados benéficos. Diversas pesquisas demonstraram que estudos *in vitro* promoveram efeitos imunomoduladores. Cuesta et al. (2002) incubaram leucócitos provenientes da porção cranial do rim de *Sparus aurata* L. com levamisol e observaram

melhora da atividade citotóxica de linfócitos. No presente estudo, a escolha pelo período curto de administração seguiu o protocolo de Mulero et al. (1998), Sahoo e Mukherjee, 2001, Cuesta et al. (2002), Kumari e Sahoo (2006) e Li et al. (2006), no qual diversos parâmetros do sistema imune inato foram beneficiados, entretanto outros estudos tais como Misra et al. (2009), que ofereceram o imunoestimulante por 56 dias para *Labeo rohita* e Maqsood et al. (2009), que realizaram administrações por até 70 dias em *Cyprinus carpio*, demonstram que protocolos prolongados do imunoestimulante promoveram melhores respostas.

A inclusão de componentes nas dietas visando benefícios adicionais, tal como a adição de imunoestimulantes, tem sido tema de muitos estudos, dentre eles o levamisol, uma droga sintética com ações comprovadas em diversas espécies de peixes. A modulação do sistema imune através destas substâncias é uma alternativa para o uso de antibióticos e o pacu é uma espécie de grande interesse econômico e novos estudos com outros protocolos experimentais devem ser aplicados na tentativa de explorar os efeitos do levamisol na imunidade inata desta espécie.

## 5. Conclusões

A administração de levamisol por sete e 15 dias promoveu alterações moderadas em parâmetros imunológicos e hematológicos de pacu. A administração por sete ou por 15 dias ( $125 \text{ mg kg}^{-1}$ ) do levamisol pode promover imunomodulação, entretanto um efeito consistente não ficou claro. Os resultados sugerem necessidade da continuidade dos estudos e o aperfeiçoamento dos protocolos experimentais pela importância que se reveste o uso de imunoestimulantes na criação de peixes.

## 6. Referências Bibliográficas

ALEXANDER, J.B.; INGRAM, G.A. Noncellular non-specific defense mechanisms of fish. **Annual Revision of Fish Disease**, v.2, p.249–279. 1992.

ALY, S.M.; AHMED, Y.A.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.128-136. 2008.

ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Shariff, M.; Arthur, J.R.; Subasinghe, R.P. (Ed.) **Diseases in Asian Aquaculture II**. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p.185-202. 1995.

ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Revision of Fish Disease**, v.2, p.281–307. 1992.

BAYNE, C.J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p.725-743. 2001.

BRADLEY, S.G. Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxins. **Annual Review in Microbiology**, v.33, p.67-94. 1979.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Levamisole is a potent enhancer of gilthead sea bream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.89, p.169–174. 2002.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Total serum immunoglobulin M are affected by immunomodulators in sea bream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.203–210. 2004.

DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B.R.; GRAY, W. L. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. **Aquaculture**, v.214, p.55–66. 2002.

ELLIS, A.E. Immunity to bacteria in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p.291–308, 1999.

ELLIS, A.E. Innate host defense mechanism of fish against virus and bacteria. **Development and Comparative Immunology**, v.25, p.827-839. 2001.

ESPELID, S.; LOKKEN, G.B.; STEIRO, K.; BOGWALD, J. Effects of cortisol and stress on immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.6, p.95-110. 1996.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS – FAO., 2008: Fishery Information, Data and Statistics Unit. FishStat plus: universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. Rome, 2006. Available in: <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>



FINDLAY, V.L.; ZILBERG, D.; MUNDAY, B.L. Evaluation of levamisole as a treatment for amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Disease**, v.23, p.193–198. 2000.

GEETS, A.; LIEWES, E.W.; OLLEVIER, F. Efficacy of some antihelminthics against the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. **Disease of Aquatic Organism**, v.13, p.123–128. 1992.

GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**, v.255, p.179–187. 2006.

ISPIR, U.; DORUCU, M. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Turkish **Journal of Veterinary and Animal Science**, v.29, p. 1169–1176. 2005.

JAH, A.K.; PAL, A.K.; SAHU, N. .; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S.C. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA,  $\omega$ -3 fatty acid and  $\beta$ -carotene in *Catla catla* juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p.917–927. 2007.

JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1991. **Levamisole**. WHO Food Additive Series v.27, p.75–101.

KAJITA, Y.; SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASH, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology**, v.25, p.93–98. 1990.

KLEIN, J. **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc., 990. p.311-334.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Dietary  $\alpha$ -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v.29, p.95-101. 2006.

LEANO, E.M.; GUO, J.J.; CHANG, S.L.; LIAU, I.C. Levamisole enhances non-specific immune response of cobia, *Rachycentron canadum* fingerlings. **Journal of the Fisheries Society of Taiwan**, v.30, p.321–330. 2004.

LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D.M. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). **Aquaculture**, v.251, p. 201–209. 2006.

MAQSOOD, S.; SAMOON, M.H.; SINGH, P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of

*Aeromonas hydrophila*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.9, p.111-120. 2009.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; POLIZELLO A.C.; AZZOLINI, A.E.; LUCISANO-VALIM Y.M. The influence of antibody functional affinity on the effector function involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. **Immunology Investigation**, v.28, p. 89-101. 1999.

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. Immune response, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings fed with levamisole supplemented diets for longer duration. **Aquaculture Nutrition**, v.15, p.356-365. 2009

MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MUNOZ, J.; MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.49–62. 1998.

MUNDAY, B.L.; ZILBERG, D. Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. **Bull. Eur. Association of Fish Pathology**, v.23, p.3–6. 2003.

OLIVEIRA, A.M.B.M.S.; CONTE, L.; POSSEBON, J.E. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt; Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.217-238. 2004.

PAULSEN, S.M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. *In vivo* effects of B-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Shellfish Immunology**, v.14, p.39- 54. 2003.

POST, G. **Fish Health**. T.F.H. Publications. p.37-41. 1987.

QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C.; SCORVO FILHO, J.D.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.C.; BERNARDINO, G. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture Magazine**, v.36, p.45-50. 2005.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Hematologia de peixes. In: SANTOS, H.S.L. (Ed.) **Histologia de peixes**. Jaboticabal, FCVA-UNESP, 1991. p.65-70

RAO, Y.V.; DAS, B.K.; JYOTYRMAYEE, P.; CHAKRABARTI, R. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeorohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.20, p.263-273. 2006.

RENOUX, G., 1980. The general immunopharmacology of levamisole. **Drugs** 19, 89–99.

SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) **Journal of The World Aquaculture Society**, v.41, p. 66-75. 2010.

SAHOO, P.K.; KUMARI, J. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Aquaculture Research**, v.37, p.500-509. 2006.

SAHOO, P.K.; KUMARI, J.; MISHRA, B.K Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. **Journal of Applied Ichthyology**, v.21, p.151–155. 2005.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Dietary intake of levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of healthy and aflatoxin-induced immunocompromised rohu, *Labeo rohita*. **Journal of Applied Aquaculture**, v.11, p.15–25. 2001.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). **Fish and Shellfish Immunology**. 12, 1–16. 2002.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v.172, p.63-92, 1999.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p.95-103.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.19, p.293-306. 2005.

SIWICKI, A.K.; COSSARINI-DUNIER, M. Effect of levamisole on the lymphocyte and macrophage activity in carp (*Cyprinus carpio*). **Annual Rech Veterinary**, v.21, p.95–100. 1990.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; DIXON, O.W. In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) spleen cells with levamisole. **Development and Comparative Immunology**, v.14, p.231–237. 1990.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RAMSEY, G.L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects nonspecific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.41, p.125–139. 1994.

SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E. The determination of lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v.58, p.731-736. 1949.

VANDEPITTE, J.; ENGBAEK, K.; PIOT, P. **Métodos básicos de laboratório em bacteriologia clínica**. Genebra: Organização Mundial de Saúde, 1993. 122p.

VAZZANA, M.M.; CAMMARATA, E.L.; COOPER, N. PARRINELLO. 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. **Aquaculture**, v.210, p.231–224. 2002.

WON, K.M.; KIM S. M.; PARK, S.I. The effects of b-1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. **Journal of Fish Pathology**, v.17, p.29–38. 2004.

### **CAPITULO 3 – Imunização contra *Aeromonas hydrophila* em pacu *Piaractus mesopotamicus* após administração de levamisol.**

**RESUMO** – O aparecimento de doenças em peixes de criação intensiva é um problema enfrentado no Brasil e no mundo todo. O uso de imunoeestimulante e imunização são técnicas muito utilizadas que visam a melhora do sistema imune de peixes. O presente estudo avaliou os efeitos da administração de levamisol por sete dias e a imunização com *A. hydrophila* em pacus sobre parâmetros do sistema adquiridos e inato de defesa. A imunização e a administração de levamisol promoveram aumento do título de anticorpos, atividade bactericida do soro, hematócrito, número de eritrócitos, leucócitos totais e trombócitos nos pacus. Os valores da atividade e concentração de lisozima, atividade respiratória de leucócitos, proteína total, albumina, globulina, índice A:G, hemoglobina e volume corpuscular médio, e demais células brancas de defesa não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle. A administração de levamisol por sete dias e a imunização de pacus promoveu melhora de alguns parâmetros da imunidade adquirida e inata de defesa. Entretanto outros protocolos devem ser estudados para avaliar o efeito do levamisol sobre o sistema imune de pacus.

**Palavras chaves:** Imunização, título de anticorpos aglutinantes, título de anticorpos hemaglutinantes, lisozima, atividade bactericida do soro

**Abstract:** Diseases outbreaks in intensive fish farming are a problem in Brazil and worldwide. Immunostimulants and immunization are very useful to improve the immune system of fish. This study evaluated the effects of levamisole administration for seven days and immunization with *A. hydrophila* in pacus on acquired and innate immune system. Immunization and levamisole administration promoted increased antibody titre, serum bactericidal activity, hematocrit, red blood cell, leucocytes and thrombocytes in pacus. The values of activity and concentration of lysozyme, respiratory activity of leucocytes, total protein, albumin, globulin, A:G index, corpuscular hemoglobin volume, and other white blood cells did not present significant differences when compared with the control. Administration of levamisole for seven days and immunization of pacus improved some parameters of acquired and innate defence. However other protocols must be studied to assess the effect of levamisole on the immune system of pacus.

**Keywords:** Immunization, antibody agglutination titre, antibody hemagglutination titre, lysozyme, serum bactericidal activity

## 1. Introdução

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), espécie da família Characidae e subfamília Myleinae, possui características zootécnicas que a tornam uma das espécies nativas mais importantes da piscicultura no Brasil (Oliveira et al., 2004; Queiroz et al., 2005; Urbinati et al., 2010). É uma espécie bastante estudada em relação à reprodução (Romagosa et al., 1990), larvicultura (Jomori et al., 2003), alimentação e nutrição (Souza et al., 2000; Bechara et al., 2005; Takahashi et al., 2006; Abimorad et al., 2007, 2009; Bicudo et al., 2009), mas há grande carência de conhecimentos no que se relaciona à fisiologia do sistema imune da espécie (Belo et al., 2005; Garcia et al., 2007; Abreu et al., 2009; Sado et al., 2010).

O sistema imune de peixes é dividido em inato ou não específico e específico ou adaptativo, ambos divididos em defesa mediada por células e humorais. O sistema inato é constituído de componentes celulares e moleculares que estão presentes no sangue e fluídos corpóreos que atuam rapidamente para manter o equilíbrio do hospedeiro. Dentre estes componentes estão as proteínas do sistema complemento, o sistema de enzimas antimicrobianas, os mediadores não específicos da imunidade tais como o interferon, as interleucinas e as células de defesa, como os granulócitos, monócitos, macrófagos e as células *natural killer*. Por outro lado, o sistema específico necessita da presença do antígeno para desencadear reações que culminarão no aumento de anticorpos circulantes específicos para tais invasores, e promoverá em consequência, memória imune (Bayne, 2001; Ellis, 2001).

Agentes virais, bacterianos, fúngicos e parasitários podem provocar doenças em peixes. Entre os mecanismos inatos contra a invasão de microrganismos, estão a produção de diversos compostos antimicrobianos, proteínas de fase aguda da inflamação, ação do complemento ativado pela via alternativa, citocinas, fagocitose e consequentemente, a inflamação. Já entre os componentes específicos estão os anticorpos e os linfócitos, que compõem a defesa específica humoral e mediada por células, respectivamente. Os anticorpos ligam-se aos microrganismos e ativam a fagocitose, ou ainda promovem neutralização e opsonização do agente, bem como ativação do complemento e citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (Ellis, 2001).

As respostas do sistema imune de peixes podem ser influenciadas por algumas substâncias, tais como o levamisol. Este composto é uma droga anti-helmíntica sintética utilizada em mamíferos, que apresenta uma potente ação sobre os sistemas imunes inato e específico de peixes (Cuesta et al., 2002). Este imunoestimulante promove melhora de alguns parâmetros, tais como a atividade citotóxica de leucócitos (Cuesta et al., 2002), a fagocitose (Mulero et al., 1998; Findlay e Munday, 2000), a atividade respiratória de macrófagos (Siwicki, 1989; Mulero et al., 1998), e, indiretamente, melhora as respostas imunes específicas (Jeney e Anderson, 1993; Cuesta et al., 2004), promovendo assim, aumento da resistência contra diversos agentes etiológicos,

tais como *Vibrio anguillarum* (Kajita et al., 1990), *A. hydrophila* (Baba et al., 1993), *Paramoeba* sp. (Findlay et al., 2000; Munday e Zilberg, 2003), *Edwardsiella tarda* (Sahoo e Mukherjee, 2002), *Photobacterium damsela* (Leano et al., 2003) além de nematóides como *Anguillicola crassus* (Geets et al., 1992).

O aparecimento de doenças, apesar das defesas do organismo, pode ocorrer principalmente devido ao excesso de matéria orgânica na água, em situações de estresse ou presença de parasitos (Post, 1987). Em pisciculturas brasileiras o agente causal *Aeromonas hydrophila* é responsável por muitos surtos além de ser considerado grave problema econômico (Vieira, 2003). Adicionado a isto, o uso indiscriminado de antimicrobianos em doses sub-terapêuticas resultam no aumento da resistência bacteriana em todo o mundo (Vivekanandhan et al., 2002).

Atualmente, estudos indicam que as defesas contra microrganismos podem ser estimuladas, com aumento da concentração de anticorpos circulantes, através da imunização. Quando a imunização é realizada conjuntamente a administração de levamisol, as respostas de defesa são aumentadas e a proteção contra o patógeno é mais efetiva (Jeney e Anderson, 1993). Assim, na aquicultura, a imunização e o uso de imunoestimulante podem ser uma alternativa ao uso de antibióticos (Romano e Mejía, 2003). Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do levamisol suplementado na ração administrado por sete dias, nas respostas imunológicas e hematológicas de pacus imunizados com *Aeromonas hydrophila*. O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (protocolo número 004206/10).

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Acondicionamento e manejo dos peixes**

O presente estudo utilizou 240 exemplares de pacu, com peso médio de  $218,9 \pm 47,0$  g e comprimento total  $21,3 \pm 1,4$  cm, distribuídos em 24 caixas de polietileno de 100 litros, dispostas em sistema de circulação aberta, com renovação contínua de água



proveniente de poço artesian, com temperatura constante (aproximadamente 29 °C). Após período de 20 dias de aclimação ao ambiente experimental, os peixes passaram a receber as rações experimentais.

## **2.2. Delineamento experimental**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 12 tratamentos em esquema fatorial, com quatro níveis de levamisol na ração (0, 125, 250 e 500 mg kg<sup>-1</sup>) e três amostragens (sete dias de alimentação; sete dias de alimentação após a inoculação com tampão PBS e sete dias de alimentação após imunização com *A. hydrophila*) com seis repetições por tratamento. Os animais inoculados com tampão PBS foram considerados controle negativo.

## **2.3. Ração experimental e período de administração**

O levamisol foi incorporado à ração comercial (28% PB, 3.000 kcal ED kg<sup>-1</sup>) moída e peletizada com o imunoestimulante. Durante a fase de aclimação e período experimental, os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, em duas refeições diárias, às 9 e 17 horas.

## **2.4. Amostragem**

Após sete dias recebendo as rações experimentais, dois peixes de cada uma das caixas que compunham os tratamentos (12 peixes por tratamento) foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (0,1 g L<sup>-1</sup>), submetidos à retirada de sangue por punção do vaso caudal e, em seguida, pesados e medidos. O sangue foi processado para as análises imunológicas, bioquímicas e hematológicas. O restante dos peixes foi

imunizado com *A. hydrophila*, tampão PBS e hemácias de coelho, e permaneceram nas respectivas caixas por mais 15 dias, quando uma coleta adicional foi realizada, na qual dois peixes de cada caixa (12 peixes por tratamento) foram novamente amostrados como descrito anteriormente.

## **2.5. Imunização de pacus com *A. hydrophila***

Os peixes anestesiados foram inoculados por injeção intraperitoneal de 1 mL de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de *A. hydrophila* inativada com formalina a 3%. As cepas de *A. hydrophila* utilizadas foram fornecidas pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aquicultura da UNESP. Após este procedimento os peixes permaneceram 15 dias recebendo ração comercial livre de levamisol (28% PB, 3.000 kcal ED kg<sup>-1</sup>), sendo, então, amostrados como já descrito.

## **2.6. Imunização de pacus com hemáceas de coelhos**

O sangue de coelhos foi misturado ao mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante foi filtrada em gaze estéril. No momento do uso, as hemácias foram ressuspensas, lavadas e centrifugadas (3000 g por 3 min, 4°C) por três vezes com o tampão fosfato estéril (PBS, composto por NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,9 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,49 mM, em água destilada Milli-Q qsp 1 litro), com pH 7,4. A suspensão foi diluída em tampão fosfato estéril a 10%. Os peixes anestesiados foram inoculados por injeção intracelomática de 1 mL de suspensão de hemáceas a 10%.

## **2.7. Avaliação de parâmetros imunológicos adquiridos e inatos, bioquímicos e hematológicos**

Durante as amostragens, os peixes foram anestesiados (benzocaína, 0,1 g L<sup>-1</sup>) para retirada de sangue. Do sangue retirado com seringas sem anticoagulante separou-se soro, destinado à análise do título de anticorpos aglutinantes, título de anticorpos hemaglutinantes, atividade bactericida, proteína total e albumina. O sangue total, colocado em microtubos com anticoagulante (heparina), foi destinado à determinação da atividade respiratória de leucócitos, hemograma completo com determinação do hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio dos eritrócitos, contagem total e diferencial das células de defesa.

### **2.7.1. Parâmetros Imunes Específicos**

#### **2.7.1.1. Título de Anticorpos Aglutinantes e suspensão de *A. hydrophila***

A titulação dos anticorpos produzidos contra *A. hydrophila* foi obtida por uma reação de soroaglutinação, que é uma reação de floculação celular, na qual o antígeno é constituído por suspensão de células estáveis, neste caso as bactérias. O resultado é um aglomerado celular que pode ser visualizado a olho nu.

A titulação de anticorpos aglutinantes do soro de pacus seguiu metodologia preconizada por Plumb and Areechon (1990), Yildirim et al. (2003), Chen e Light (1994), com modificações. Inicialmente uma cepa de *A. hydrophila*, do acervo bacteriano do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA-CAUNESP - Jaboticabal), previamente caracterizada por testes bioquímicos (Bergey e Holt, 1994), foi semeada em caldo de digestão de soja e caseína (TSB) e incubada a 30° C por 24 horas. Após este período, a suspensão bacteriana foi lavada e centrifugada três vezes (3000 g por 3 min, 4°C) em tampão PBS estéril, em pH 7,4, para retirada completa do meio de cultura. A suspensão bacteriana foi inativada por tratamento com formalina a 3%, lavadas três vezes e diluída em tampão PBS estéril. Para adequação das concentrações, as

diluições foram ajustadas pela turvação segundo escala de Mc Farland em uma concentração de  $1 \times 10^9$  UFC (Vandepitte et al., 1993).

### **Reação de soroaglutinação**

Foram utilizadas microplacas de 96 cavidades de acrílico estéril, na qual 50  $\mu$ L de soro foram misturados a 50  $\mu$ L de tampão fosfato. A partir desta solução o soro foi submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2 até a penúltima cavidade. A última cavidade foi utilizada como controle negativo, onde havia apenas 50  $\mu$ L tampão PBS, mantendo um volume final de 50  $\mu$ L por cavidade, e as seguintes diluições dos soros: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048. Em seguida foram adicionados 50  $\mu$ L de suspensão de *A. hydrophila* ( $1 \times 10^9$  UFC) em todas as cavidades, e a reação foi incubada por 18 horas a 25°C em câmara úmida. O título de anticorpos aglutinantes foi definido como a última diluição do soro apresentando aglutinação visível, e os valores expressos em  $\text{Log}_{10}$  do recíproco da diluição.

#### **2.7.1.2. Título de Anticorpos hemaglutinantes e suspensão de hemáceas de coelhos e inoculação**

A titulação dos anticorpos produzidos contra hemácias de coelho foi obtida por uma reação de soroaglutinação, uma reação de floculação celular na qual o antígeno é constituído por células estáveis, neste caso, hemácias de coelhos. O resultado é um aglomerado celular que pode ser visualizado a olho nu.

Uma alíquota de sangue total de coelhos foi coletada por punção cardíaca e misturada a um mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante foi filtrada em gaze estéril. No momento do uso, as hemácias foram ressuspensas, lavadas e centrifugadas (centrifuga refrigerada a 3000 g por 3 min) por

três vezes com o tampão PBS estéril, com pH 7,4. A suspensão foi diluída em tampão fosfato estéril a 1% para realização do teste nas microplacas.

## **Reação de soroaglutinação**

Inicialmente, o soro hiperimune obtido após 15 dias da inoculação de hemácias a 10%, foi inativado a 56°C por 20 min para desnaturação de proteínas do sistema complemento, que são termo sensíveis e apresentam grande capacidade de lisar hemácias. Foram utilizadas microplacas de acrílico estéril com 96 cavidades, nas quais 50 µL de soro foram diluídos em 50 µL de tampão fosfato. A partir desta solução o soro foi submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2 até a penúltima cavidade. A última cavidade foi utilizada como controle negativo, onde havia apenas 50 µL tampão PBS, mantendo um volume final de 50 µL por cavidade, e as seguintes diluições dos soros: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048. Em seguida foram adicionados 50 µL de suspensão de hemácias de coelho a 1% em todas as cavidades, e a reação foi incubada por 1 h a 37°C. O título de anticorpos hemaglutinantes foi definido como a última diluição do soro apresentando aglutinação visível, e os valores expressos em Log10 do recíproco da diluição

## **2.7.2. Parâmetros Imunes Inatos**

### **2.7.2.1. Atividade bactericida**

A avaliação da atividade bactericida do soro dos pacus seguiu a metodologia preconizada por Kajita et al. (1990), Rao et al. (2006), Aly et al. (2008), com modificações. Inicialmente uma cepa de *A. hydrophila*, do acervo bacteriano do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA-CAUNESP-Jaboticabal), previamente caracterizada, por testes bioquímicos (Bergey e Holt, 1994), foi semeada em caldo de digestão de soja e caseína (TSB), e incubada a 30°C por 24 horas. Após

este período, a suspensão bacteriana foi lavada e centrifugada (centrífuga 3000 g por 3 min, 4 °C) em tampão fosfato estéril (PBS, composto por NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,9 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,49 mM, em água destilada Milli-Q qsp 1 litro) em pH 7,4. A suspensão bacteriana foi diluída em tampão PBS estéril na concentração de 1x10<sup>8</sup> UFC (escala de Mc Farland) (Vandepitte et al., 1993).

Para avaliação da atividade bactericida do soro, 40 µL da suspensão de *A. hydrophila* e 40 µL de soro de pacu foram incubados em microtubos estéreis por 1 hora a 37°C. Após este procedimento, uma alíquota deste homogenizado foi depositada em placas de Petri. O meio de cultura utilizado foi triptona de soja (TSA) e o método de plaqueamento foi o “pour plate”. As cepas foram incubadas por 24 horas a 30°C. O grupo positivo consistiu de placas contendo bactérias em suspensão e tampão PBS no lugar do soro. Após o período de crescimento, o número de colônias foi quantificado em contador de colônia manual e os valores expressos em porcentagem nos grupos tratados em relação ao grupo positivo.

#### **2.7.2.2. Concentração e atividade de lisozima**

A determinação da concentração e atividade de lisozima foi baseada no método clássico de lisar uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* e foi medida pela redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (Smolelis e Hartsell, 1949). A lisozima tem capacidade de atuar sobre ligações beta 1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico de membranas de parede celular bacterianas, levando a sua lise e conseqüente destruição do patógeno (Paulsen et al., 2003). A análise foi realizada por ensaio turbidimétrico, segundo Parry (1965) com adaptações.

A partir da curva padrão, determinada utilizando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha, foram quantificadas as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta. O soro de peixes de todos os tratamentos, inicialmente, sofreu tratamento térmico (banho a 56°C por 30 min) para inativação das

proteínas do sistema complemento, garantindo, assim, que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* fosse provocada exclusivamente por ação da lisozima. Assim, 50 µL soro de pacu (em triplicata) foram depositados em microplacas, de acrílico estéril de 96 cavidades, e misturados com 50 µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2). Após homogeneização, o soro foi submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2, mantendo um volume final de 50 µL por cavidade. Em cada cavidade foram adicionados 125 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2% em tampão fosfato de sódio). A redução da densidade óptica, em 450 nm, foi avaliada entre 0,5 e 5,0 min a 30°C. Os resultados em concentração (µL por mL de amostra) foram obtidos a partir da redução da  $\delta$  DO para cada volume de amostra avaliada, e os resultados em unidade de atividade ( $\text{U mL}^{-1}$ ) foi determinada como a quantidade de enzima que produziu, em 450 nm, um  $\delta$  DO de 0,001/min (Won et al., 2004).

#### **2.7.2.3. Atividade respiratória de leucócitos**

A análise da atividade respiratória de leucócitos seguiu o protocolo de Anderson e Siwicki (1995). O método consiste na determinação das EROs produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante “*nitroblue tetrazolium*” (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (Klein, 1990). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25°C. Após incubação, 50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de formazan liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Beckman DU-70S) em comprimento de onda de 540 nm (Sahoo et al., 2005).

### **2.7.3. Parâmetros Bioquímicos**

#### **2.7.3.1. Proteína total, albumina, globulina sérica e índice A:G**

A concentração de proteína total foi determinada no soro pelo método do Biureto (Kit Labtest) e a de albumina pelo método colorimétrico – verde de bromocresol (Kit Labtest). A globulina foi determinada subtraindo a albumina da proteína total e o índice albumina-globulina (A:G) foi calculado dividindo-se o valor da fração albumina pelo valor total da fração globulina de cada amostra analisada.

### **2.7.4. Parâmetros Hematológicos**

#### **2.7.4.1. Hematócrito, números de eritrócitos, hemoglobina, volume corpuscular médio, contagem total e diferencial das células de defesa**

No sangue total heparinizado foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos (NE), volume corpuscular médio dos eritrócitos (VCM), concentração de hemoglobina (Contador de Células Celm CC550) e número de células total (eritrócitos, leucócitos e trombócitos) e diferencial (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilo, célula granulocítica especial (CGE) ou leucócito granular PAS (LG-PAS) e basófilo) em extensões sanguíneas. A contagem total dos leucócitos foi realizada por método indireto, pela quantificação das células em cada 2000 eritrócitos e, por estimativa, considerando o valor total de células vermelhas obtido no contador de células. Já o diferencial de leucócitos foi quantificado contando-se 200 células e estimando para o total de leucócitos

## **2.8. Monitoramento da qualidade de água**

A água das caixas foi avaliada duas vezes por semana para mensuração da temperatura, potencial hidrogeniônico com pHmetro (Corning), oxigênio dissolvido com



oxímetro (YSI 55) e amônia total pelo método do reagente de Nessler. Os parâmetros avaliados permaneceram dentro de faixas consideradas adequadas para peixes tropicais, de acordo com Proença e Bittencourt (1994) com temperatura média de 28°C, pH  $7,42 \pm 0,36$ , O<sub>2</sub> dissolvido  $5,19 \pm 0,54$  mg L<sup>-1</sup> e NH<sub>4</sub>  $0,23 \pm 0,16$  mg L<sup>-1</sup>.

## **2.9. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) através do programa estatístico SAS (9.2).

## **3. Resultados**

### **3.1. Parâmetros Imunes Específicos**

#### **3.1.1. Título de anticorpos aglutinantes**

A suplementação de levamisol por sete dias nas concentrações de 125 e 250 mg kg<sup>-1</sup> de ração e a imunização com *A. hydrophila* promoveram maiores títulos de anticorpos aglutinantes específicos identificados a partir da reação de soroaglutinação (Figura 1).

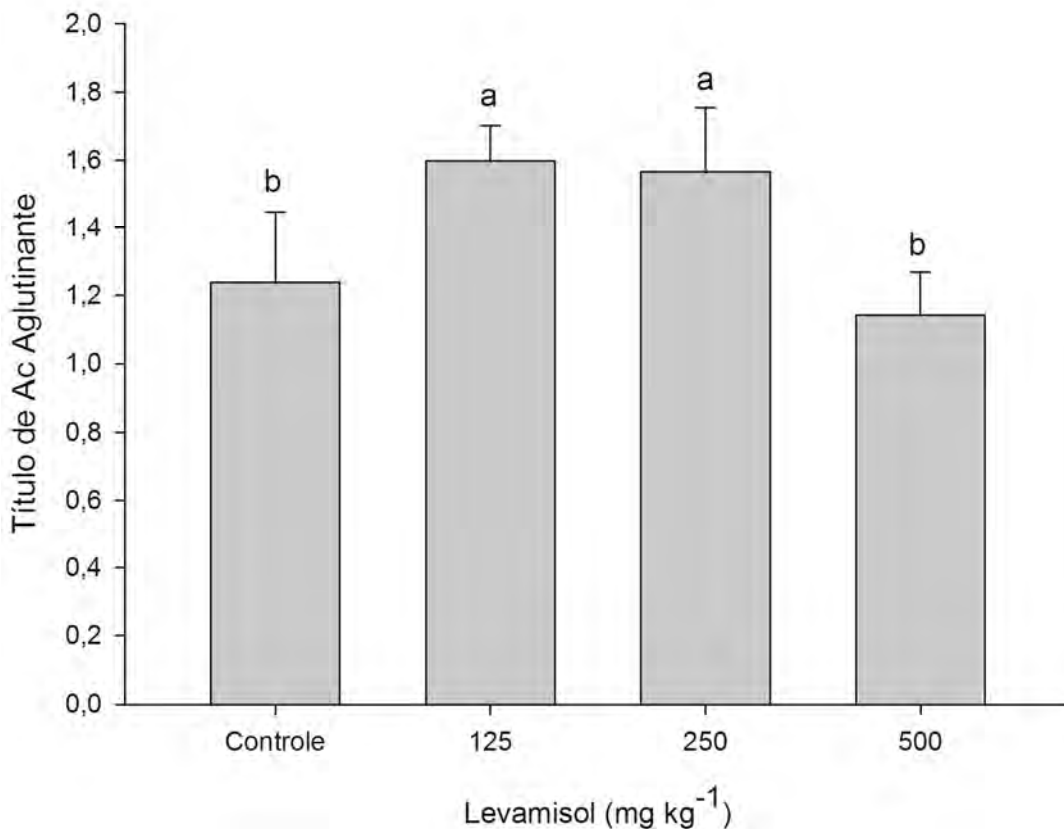


Figura 1. Título de anticorpos aglutinantes do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa entre concentrações de levamisol pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2. Título de anticorpos hemaglutinantes

A produção de anticorpos hemaglutinantes não foi influenciada pela imunização com *A. hydrophila* e administração de levamisol por sete dias nas concentrações de 125 e 250 mg kg<sup>-1</sup>. Entretanto, a administração de 500 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol promoveu diminuição do título de anticorpos aglutinantes identificados a partir da reação de soroaglutinação (Figura 2).

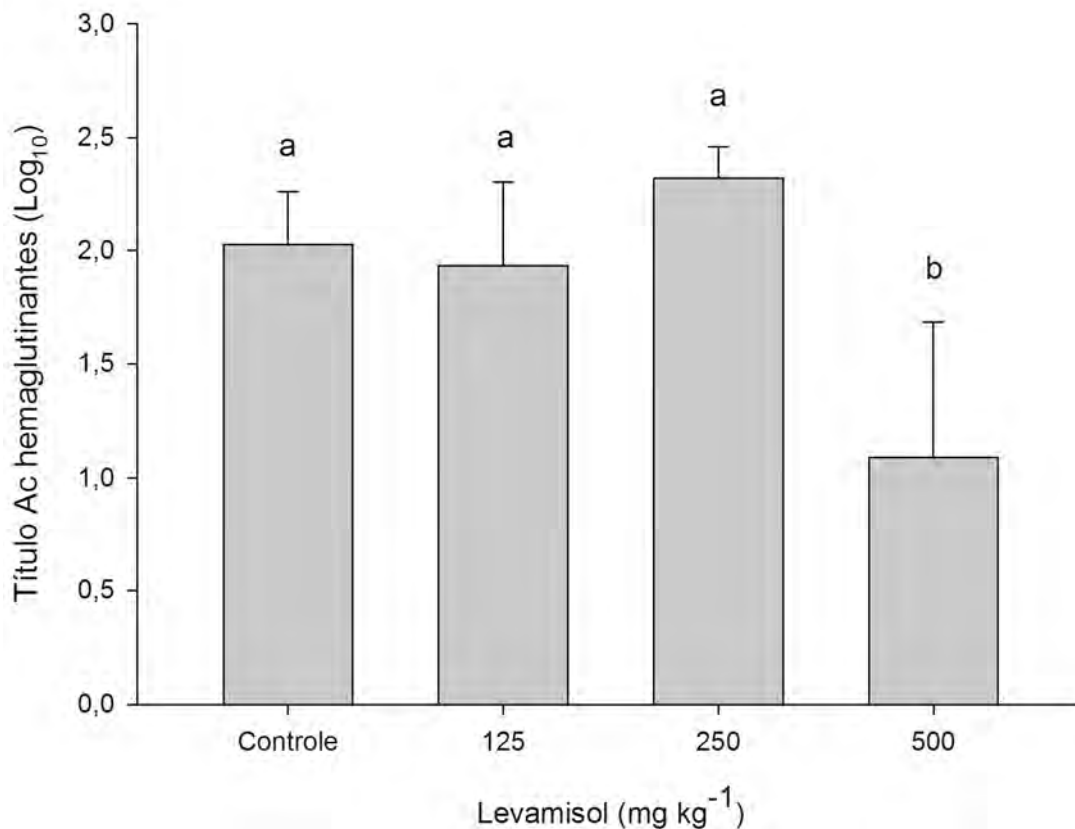


Figura 2. Título de anticorpos hemaglutinantes do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa entre concentrações de levamisol pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. Parâmetros Imunes Inatos

#### 3.2.1. Atividade bactericida do soro

Após a alimentação com o levamisol por sete dias e inoculação do agente patogênico, o soro dos pacus apresentou maior capacidade de destruir bactérias (Figura 3). O grupo positivo, no qual não foi adicionado soro de pacu, representa 100% de crescimento bacteriano, e os demais grupos representam as contagens de UFCs em relação ao grupo controle. O soro dos peixes que receberam 500 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol

na ração apresentou a maior atividade bactericida antes e após a inoculação bacteriana, quando comparado com os demais grupos.

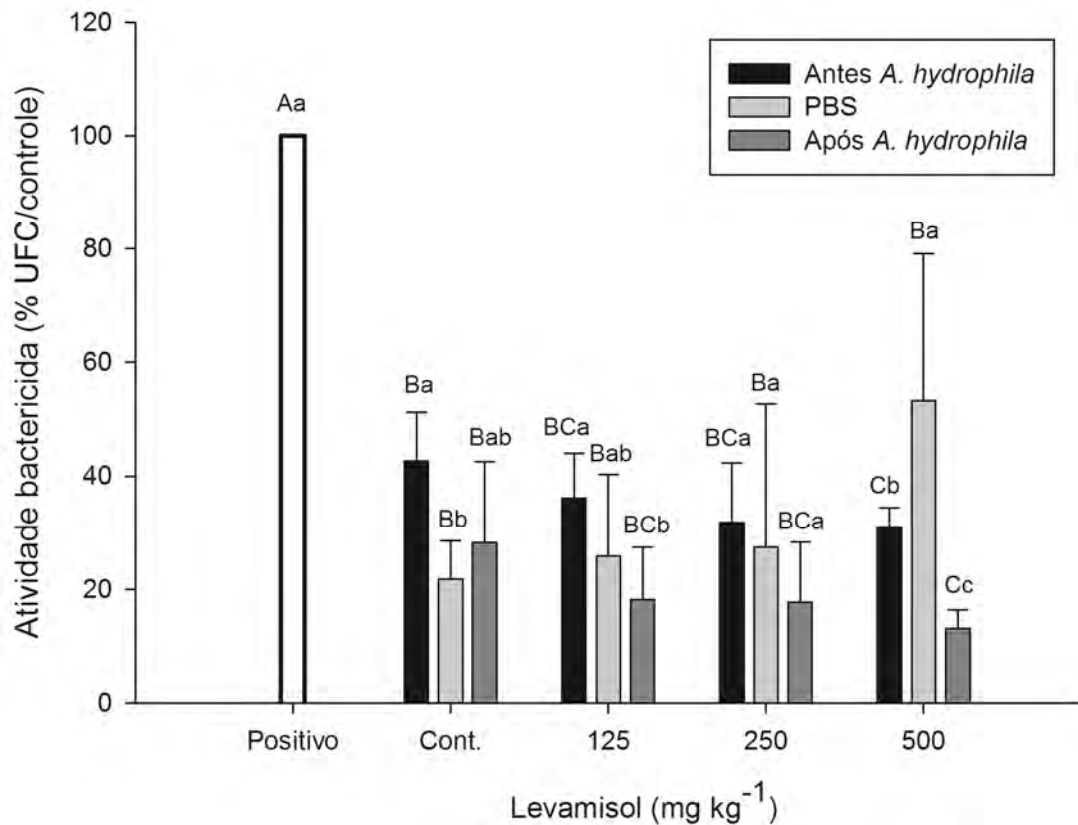


Figura 3. Atividade bactericida do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes maiúsculas indicam diferença significativa entre concentrações e minúsculas entre período de administração pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2. Concentração e atividade de lisozima

A concentração (A) e atividade (B) de lisozima, enzima importante dos fluídos corpóreos com capacidade de lisar bactérias, não foram influenciadas pela administração do levamisol ou pela imunização (Figura 4).

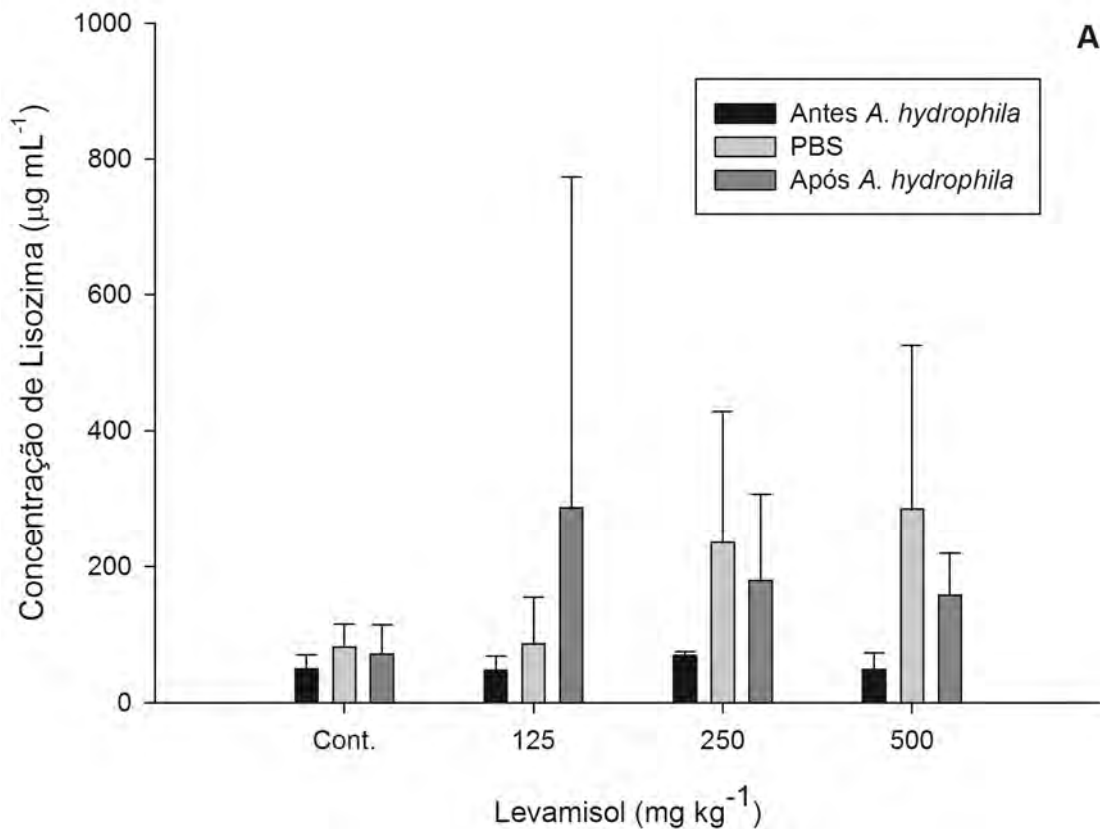


Figura 4. Concentração (A) e atividade (B) de lisozima do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3. Atividade respiratória de leucócitos

A atividade respiratória de leucócitos, avaliada pela oxidação do corante por espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas por leucócitos, não foi influenciada pela administração do imunoestimulante ou pela inoculação de *A. hydrophila* (Figura 5).

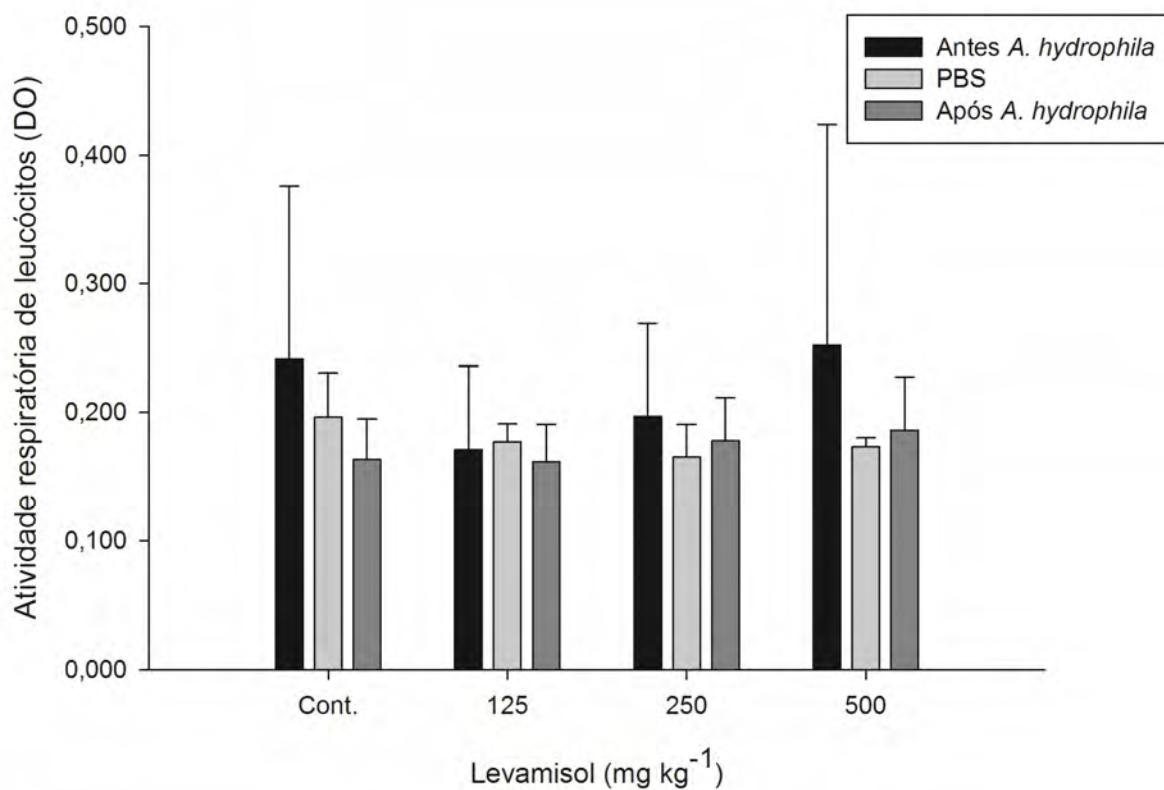


Figura 5. Atividade respiratória de leucócitos do sangue de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Parâmetros Bioquímicos

#### 3.3.1. Proteína total, albumina, globulina sérica e índice A:G

Os parâmetros bioquímicos avaliados em pacus alimentados por sete dias com levamisol e inoculados com *A. hydrophila* não apresentaram diferenças quando comparados ao controle. Os valores de proteína total (Figura 6) e albumina (Figura 7) dos grupos alimentados com o imunoestimulante apresentaram apenas uma tendência de aumento após contato com o agente bacteriano. Por outro lado, os valores de globulina sérica (Figura 8) e índice A:G (Figura 9), nos peixes alimentados com 125 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol na ração, mostraram diminuição e aumento numérico deste perfil após a injeção do patógeno, respectivamente.

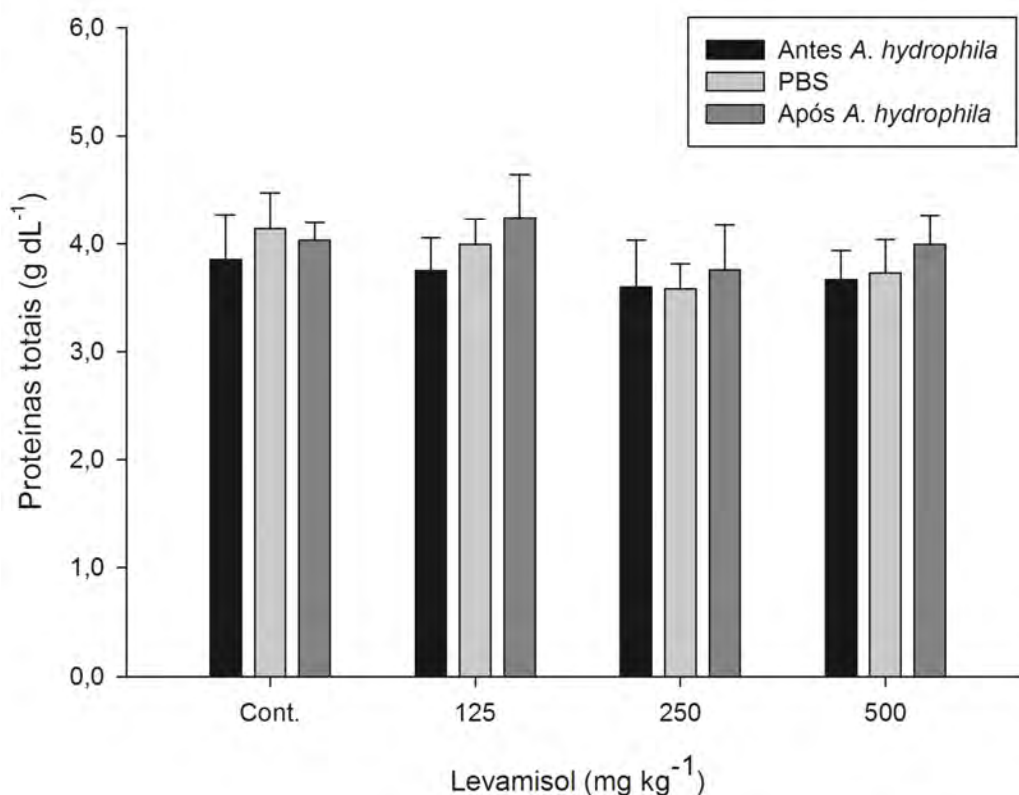


Figura 6. Concentração de proteínas totais do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

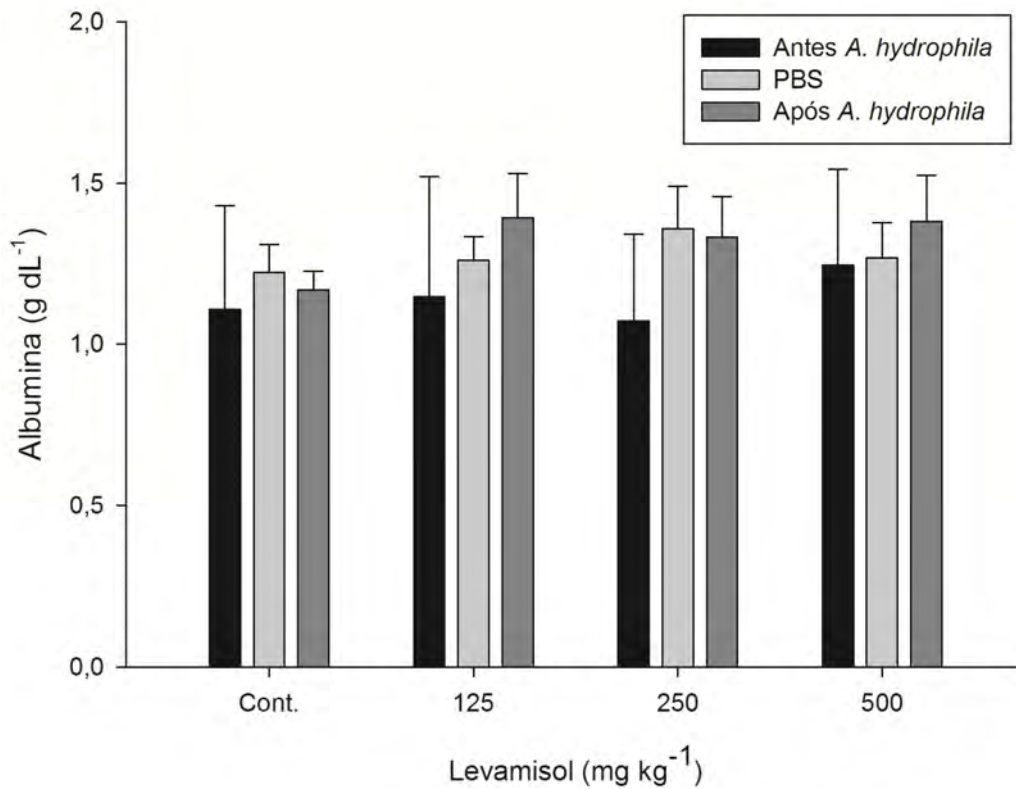


Figura 7. Concentração de albumina do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



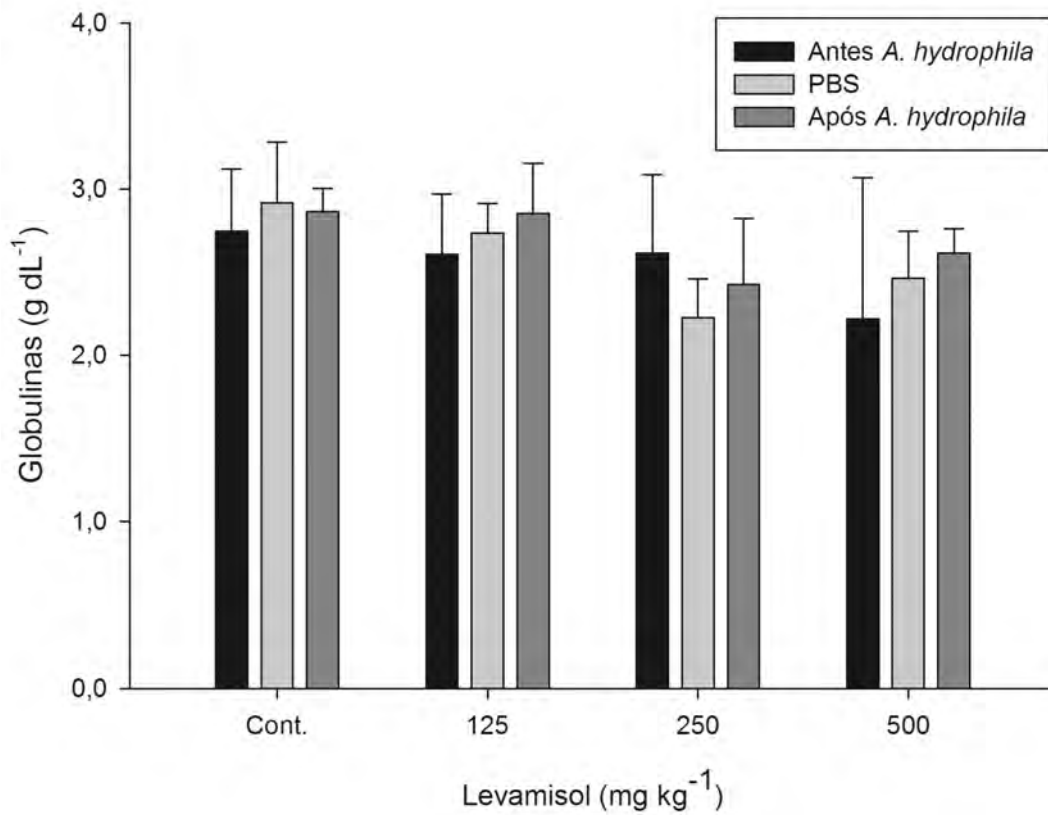


Figura 8. Concentração de globulina do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

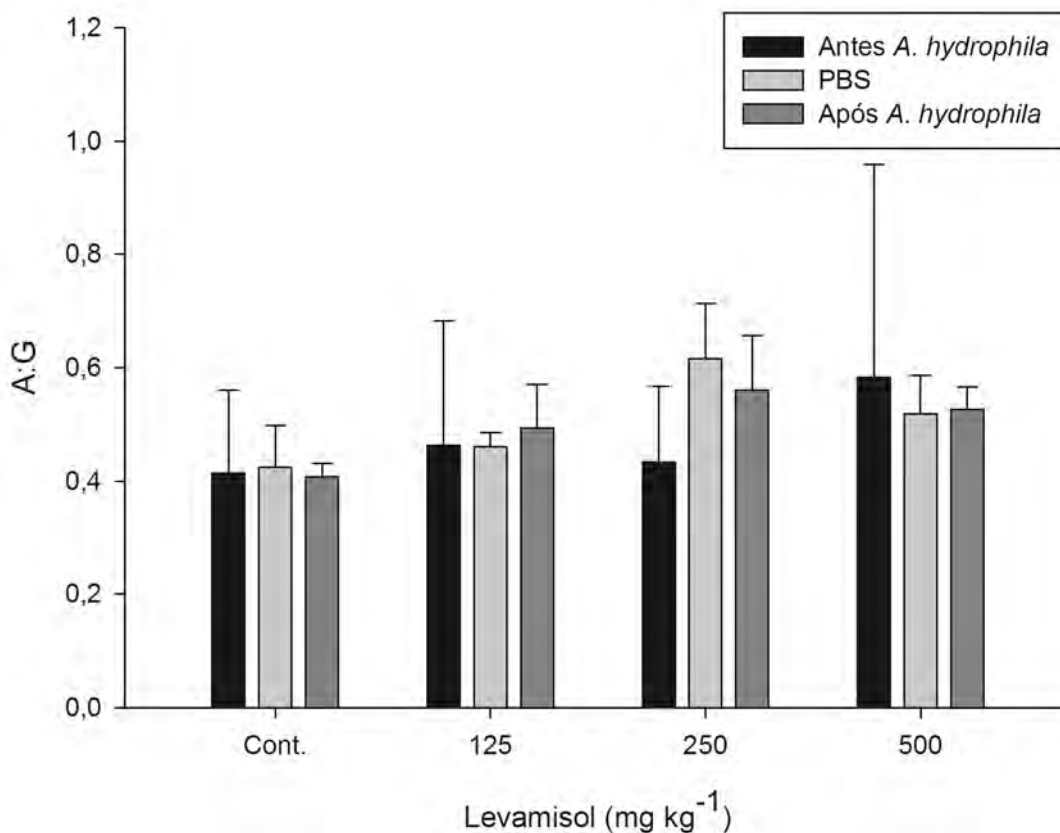


Figura 9. Índice albumina-globulina (A:G) do soro de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Parâmetros Hematológicos

#### 3.4.1. Hematócrito, números de eritrócitos, hemoglobina, volume corpuscular médio, contagem total e diferencial das células de defesa

O hematócrito e o número de eritrócitos de peixes alimentados com 125 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol na ração apresentaram-se maior quando comparado com controle após inoculação do agente bacteriano, entretanto não diferiu dos demais tratamentos (Figura 10 e 11). A inoculação de *A. hydrophila* aumentou os valores de hematócrito nos peixes

alimentados com  $125 \text{ mg kg}^{-1}$  de levamisol na ração diferindo dos peixes controle e injetados com PBS. Já nos alimentados com  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de levamisol, os valores diferiram apenas dos injetados com PBS. Por outro lado, o número de eritrócitos foi influenciado pela inoculação do agente apenas para o grupo que recebeu  $125 \text{ mg kg}^{-1}$  de levamisol na ração diferindo dos peixes controle e injetados com PBS. Já os valores de hemoglobina e VCM não foram influenciados pelo imunoestimulante ou pela inoculação bacteriana, e não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 12 e 13).

Os valores da contagem total de leucócitos e trombócitos sofreram influência da administração do levamisol e da imunização. Peixes alimentados com  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  do imunoestimulante e imunizados apresentaram valores aumentados de trombócitos (Figura 15) e leucócitos totais (Figura 16). A imunização e administração do levamisol não influenciaram os valores de eritroblastos (Figura 14), linfócitos (Figura 17), neutrófilos (Figura 18), monócitos (Figura 19), eosinófilos (Figura 20) e célula granulocítica especial (Figura 21).

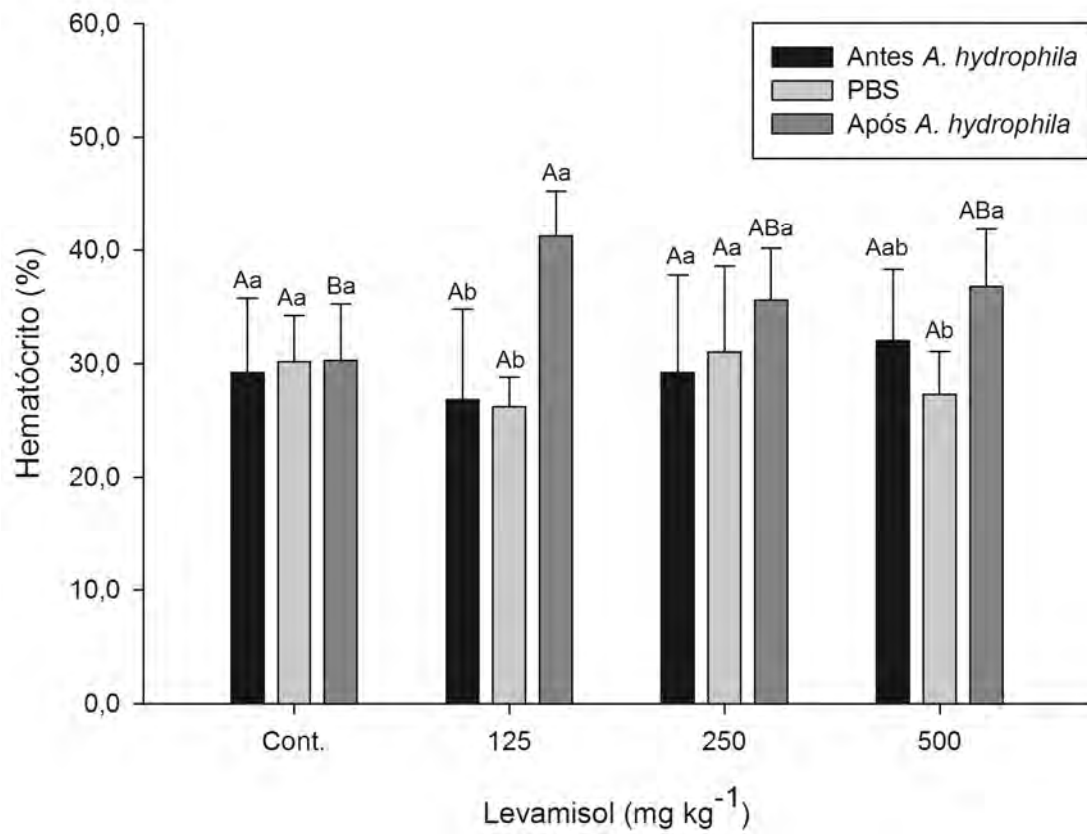


Figura 10. Hematócrito do sangue de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre concentrações de levamisol e minúsculas entre amostragens pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

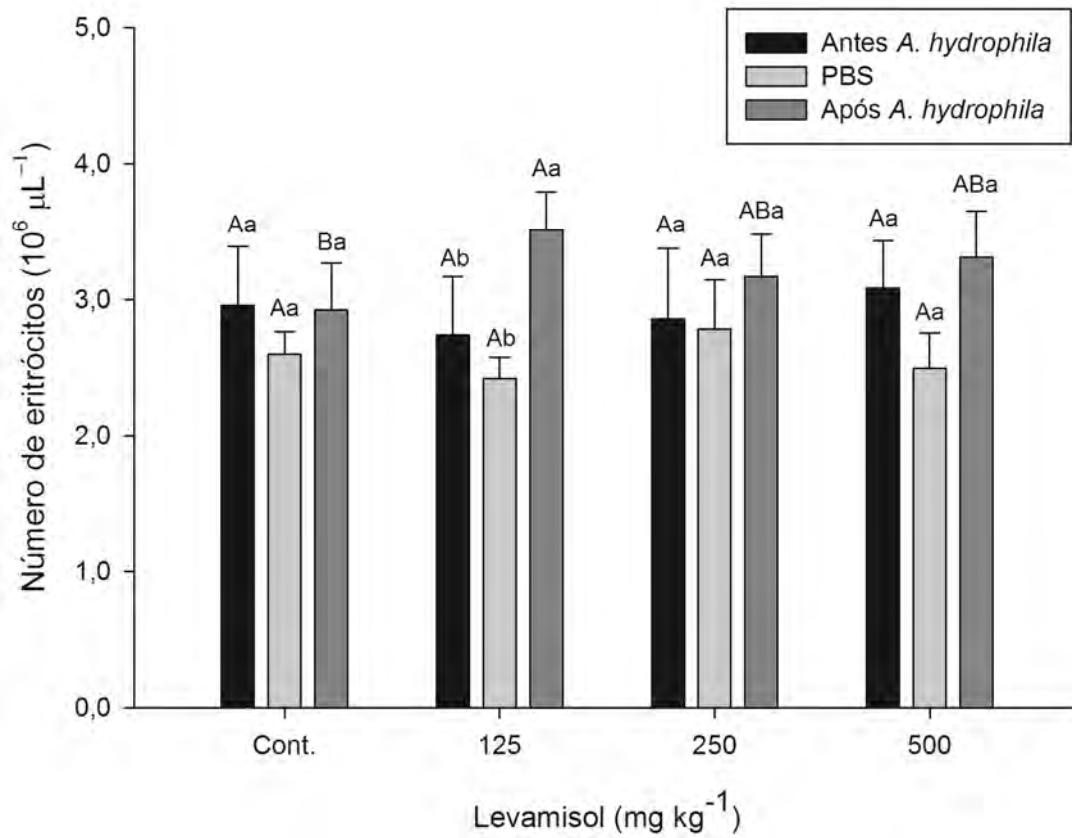


Figura 11. Número de eritrócitos do sangue de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre concentrações de levamisol e minúsculas entre amostragens pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

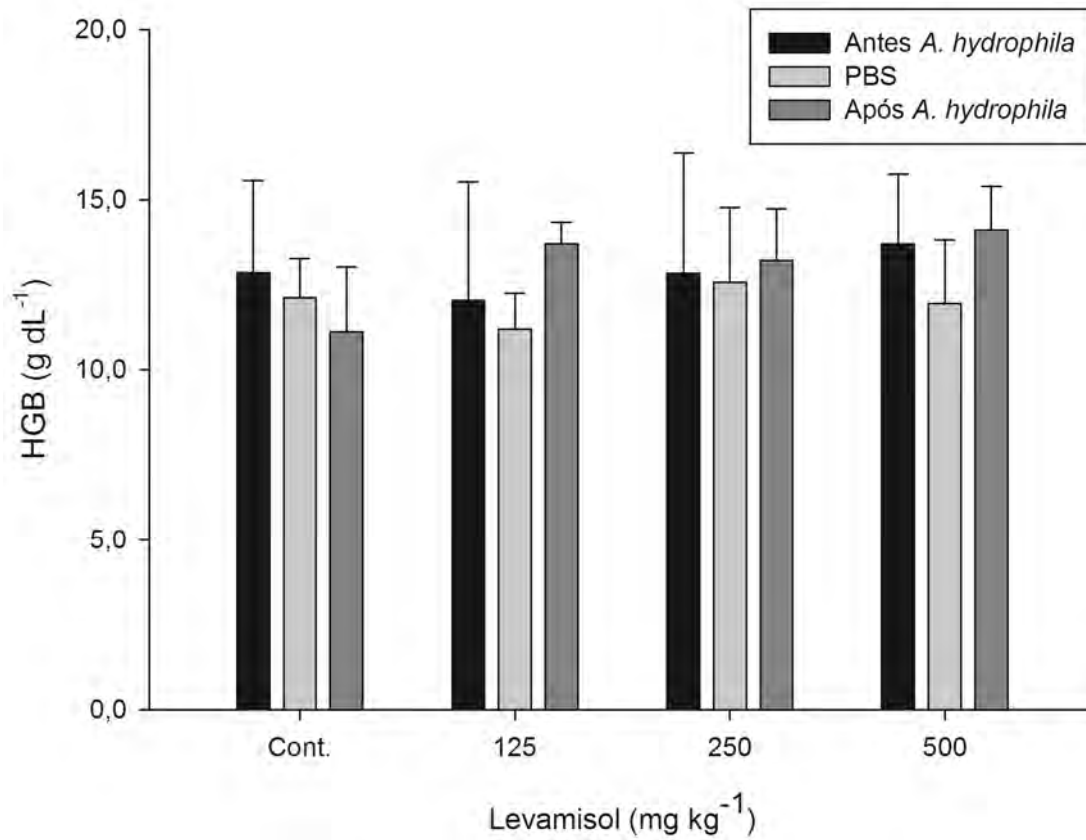


Figura 12. Concentração de hemoglobina do sangue de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

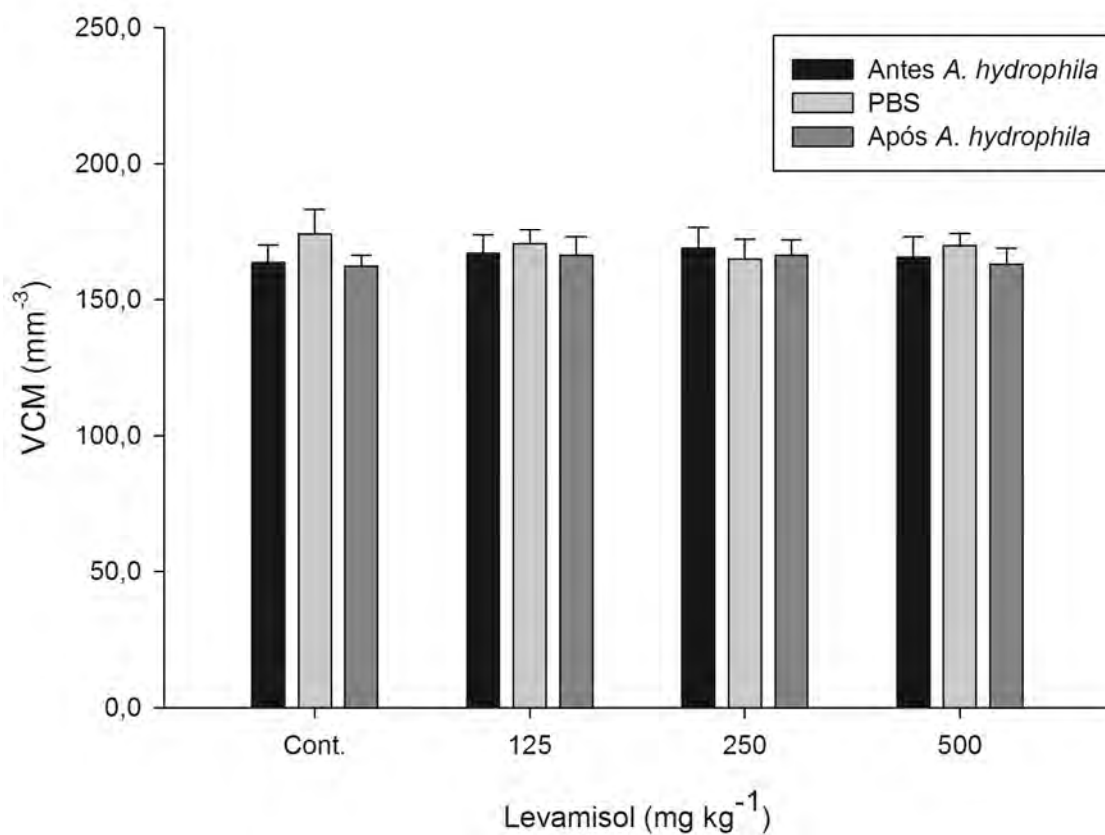


Figura 13. Volume corpuscular dos eritrócitos (VCM) de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

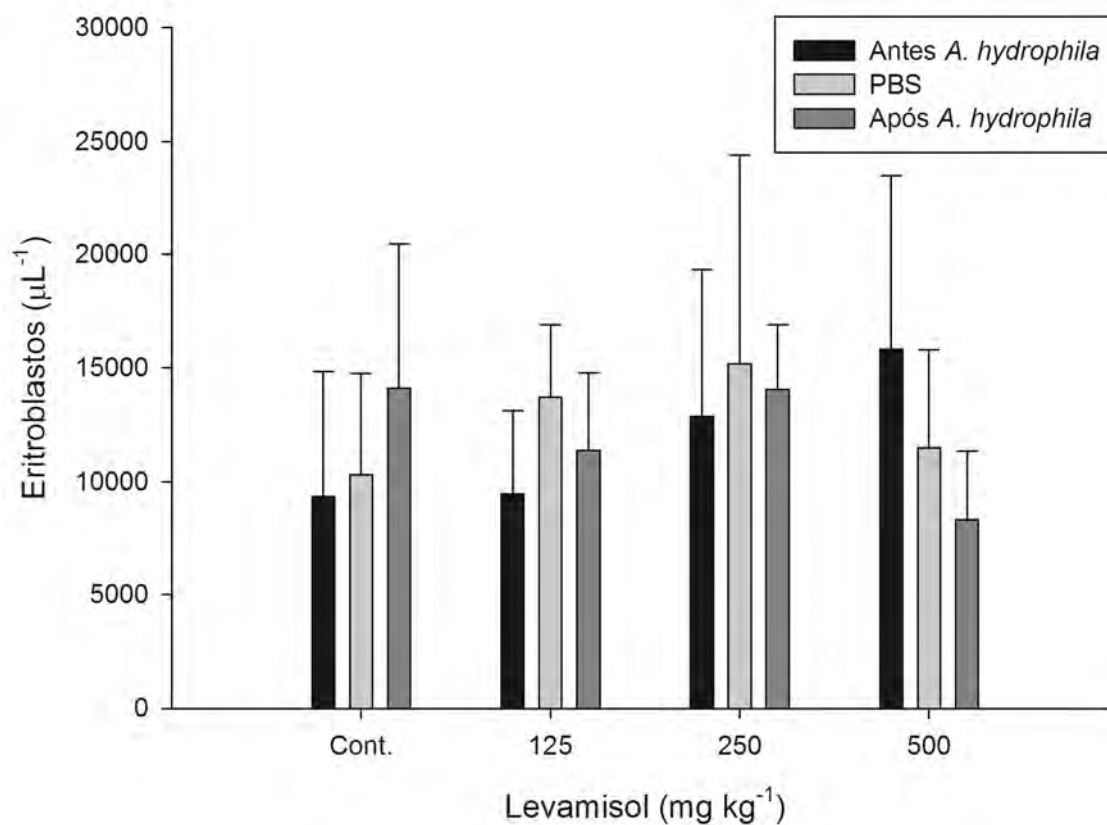


Figura 14. Eritroblastos de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



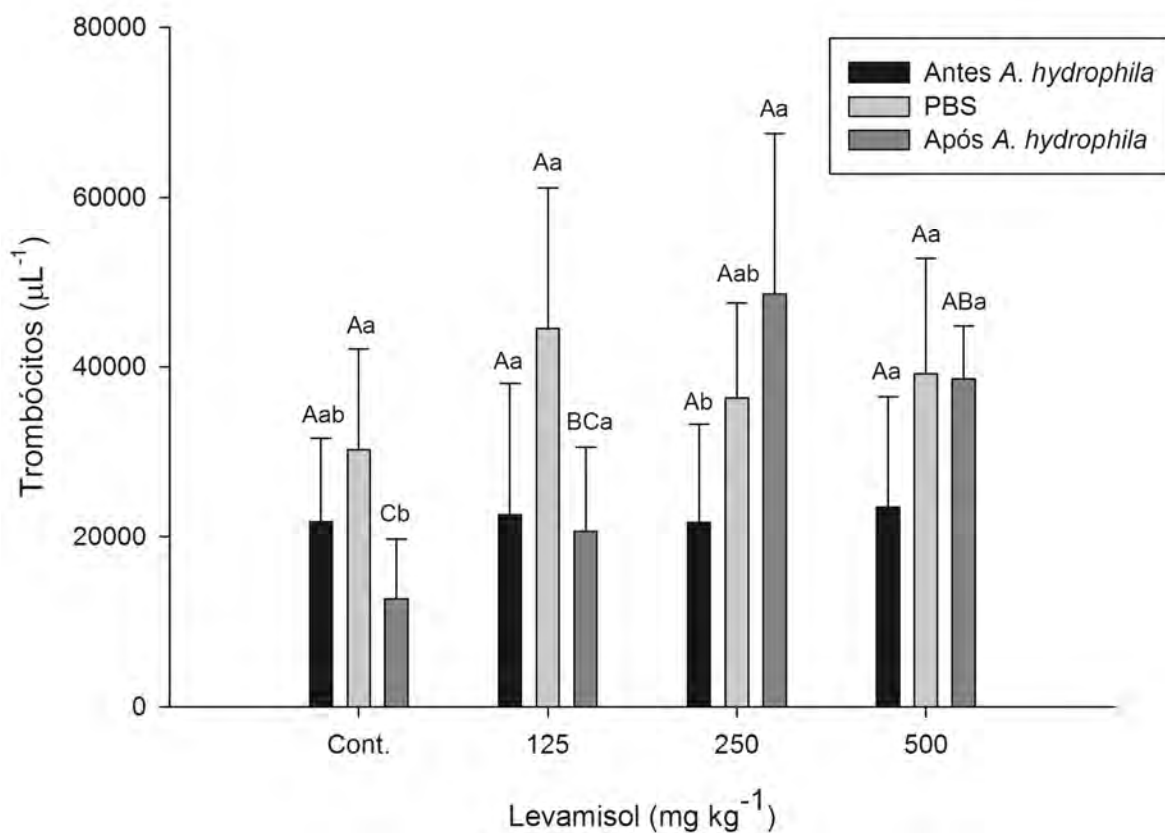


Figura 15. Trombócitos de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre concentrações de levamisol e minúsculas entre amostragens pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

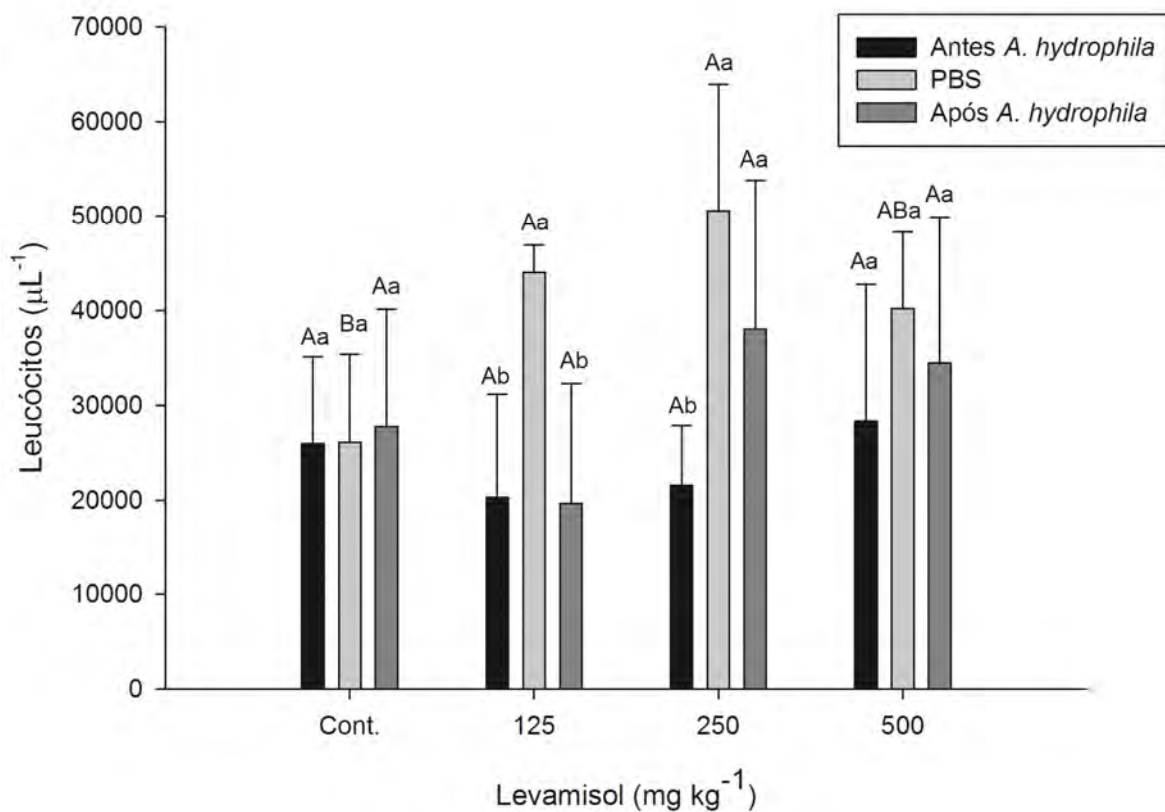


Figura 16. Leucócitos de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre concentrações de levamisol e minúsculas entre amostragens pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

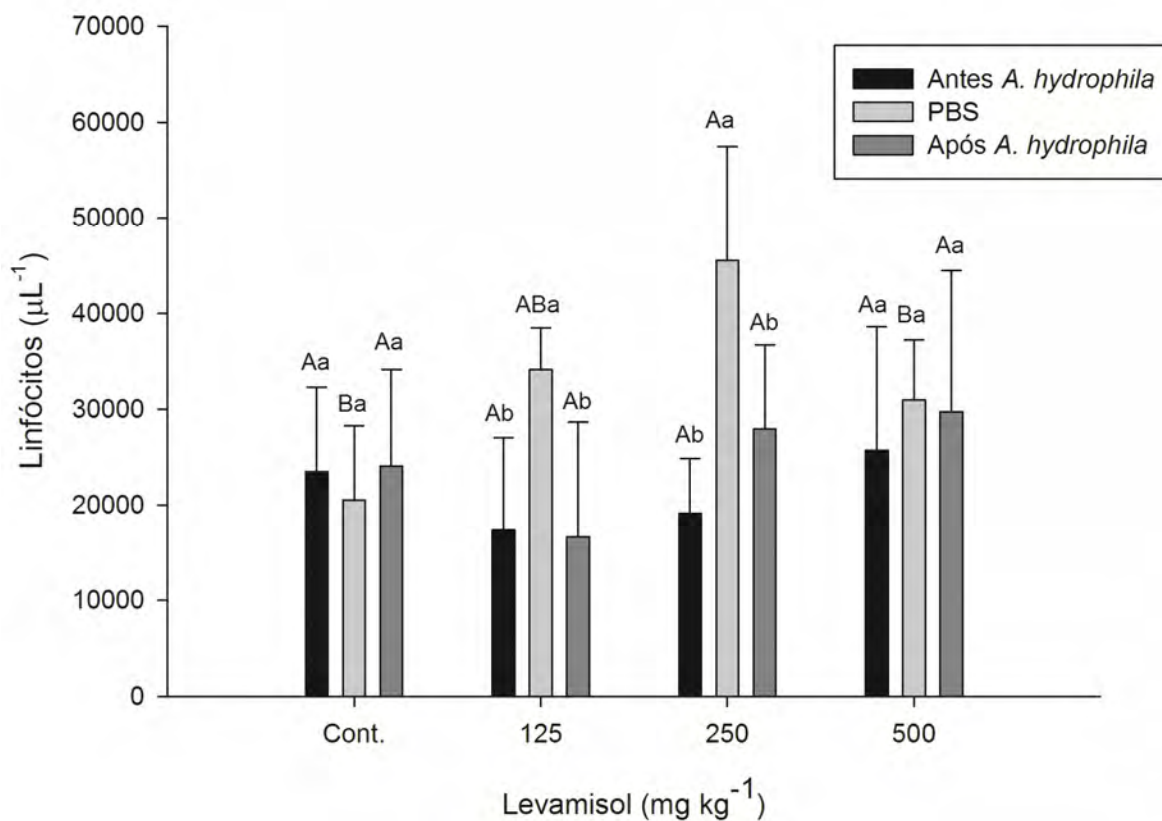


Figura 17. Linfócitos de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre concentrações de levamisol e minúsculas entre amostragens pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

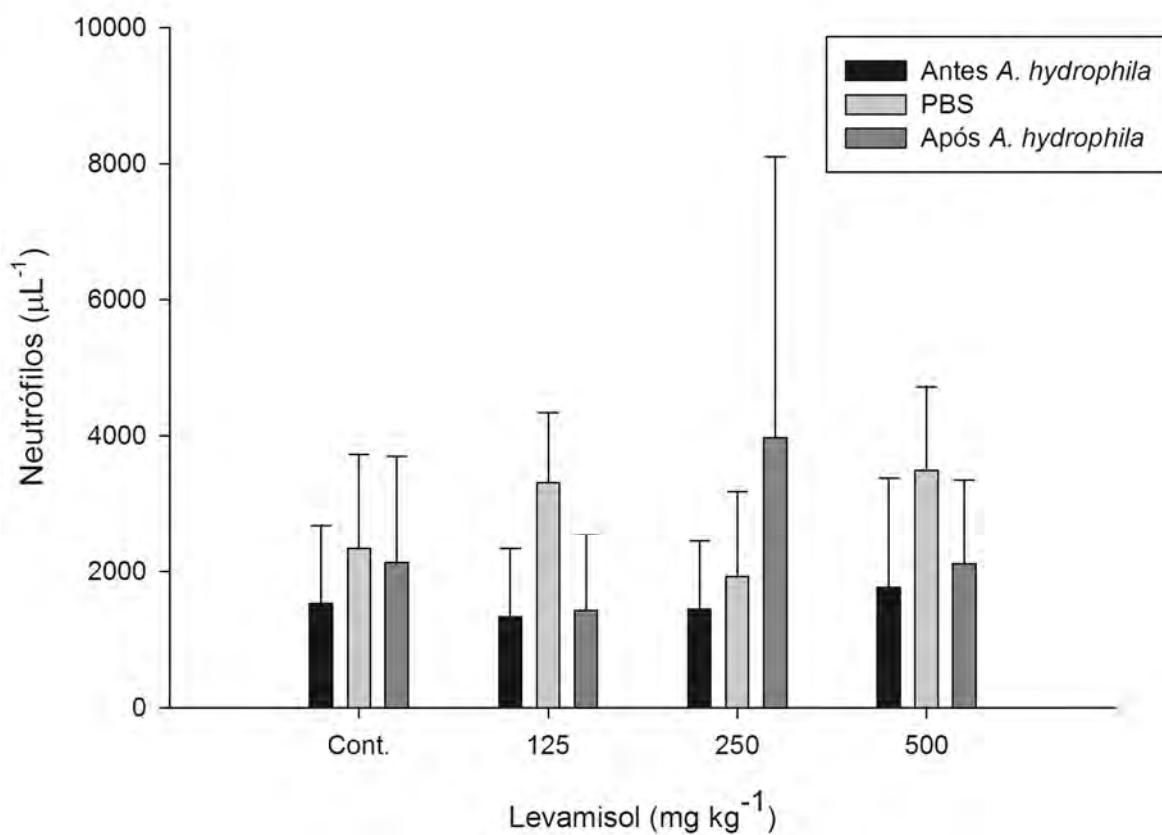


Figura 18. Neutrófilos de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre concentrações de levamisol e minúsculas entre amostragens pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

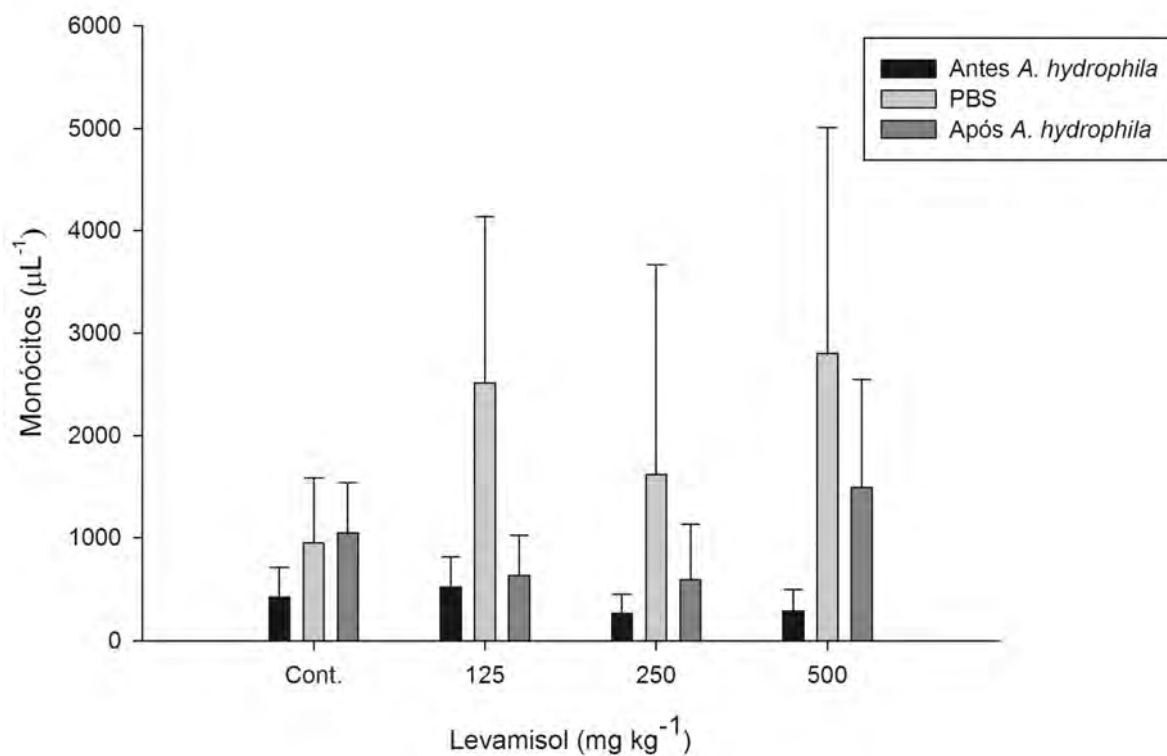


Figura 19. Monócitos de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

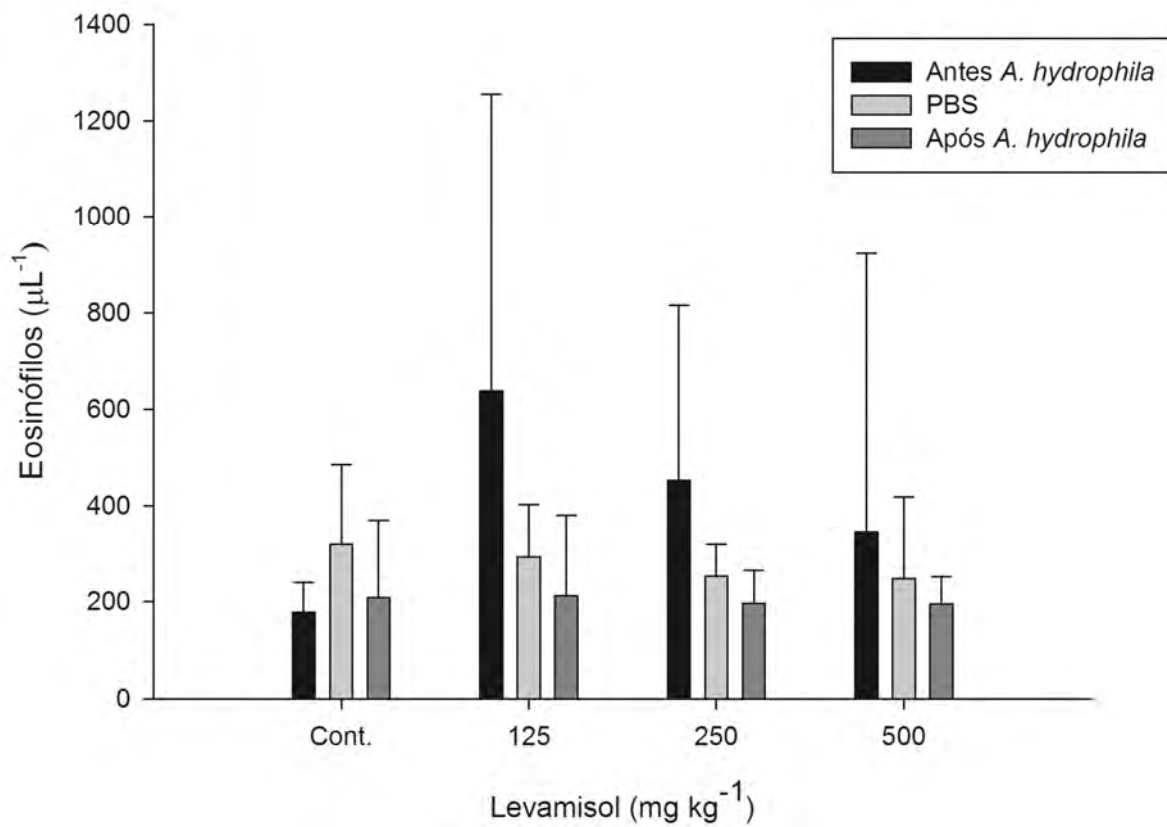


Figura 20. Eosinófilos de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

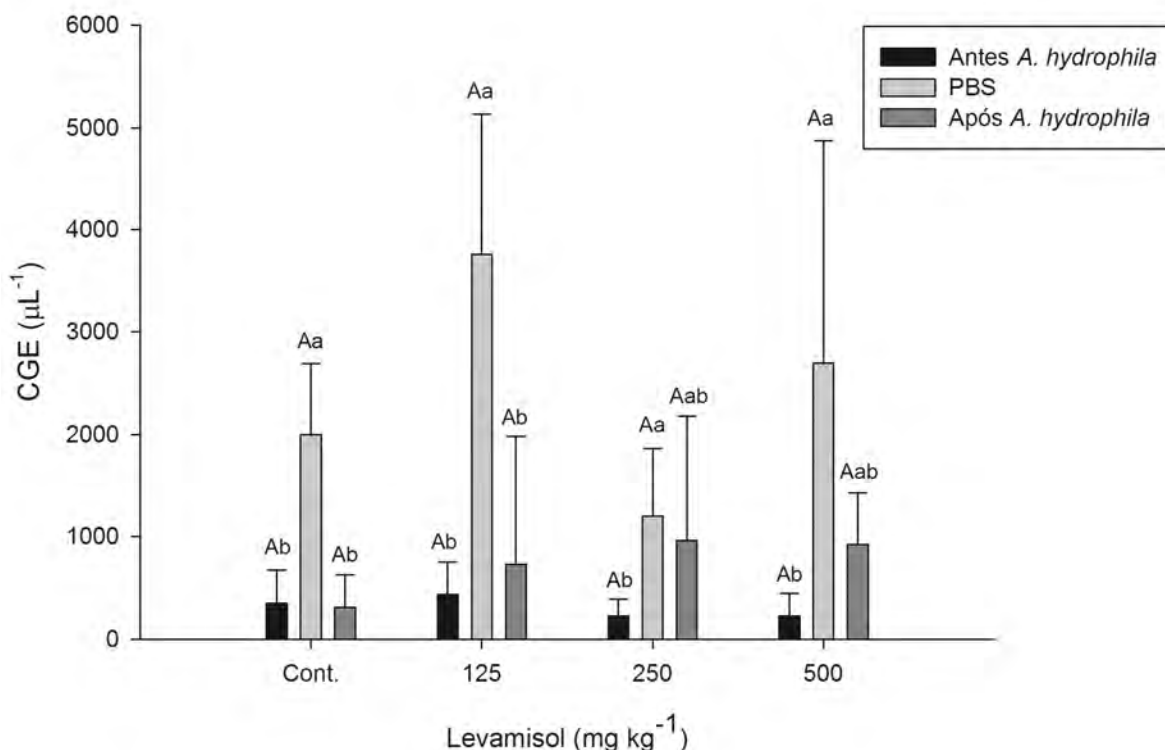


Figura 21. Célula granulocítica especial de pacus (média  $\pm$  desvio padrão) alimentados com levamisol por sete dias. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre concentrações de levamisol e minúsculas entre amostragens pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

No presente estudo a imunização e administração de 125 e 250 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol na ração por sete dias promoveram aumento no título de anticorpos contra *A. hydrophila*. Estudos com outras espécies de peixes também demonstraram a eficácia da imunização realizada em conjunto com a administração de levamisol. Jeney e Anderson (1993) observaram, em truta arco íris, aumento dos parâmetros inatos e adquiridos e maior proteção contra *A. salmonicida*. Adicionalmente, Cuesta et al. (2004) encontraram em *Sparus aurata* concentrações elevadas de IgM após duas semanas de

administração de levamisol e o efeito persistiu por mais de seis semanas. Segundo Hung et al. (1997) relataram que, em enguia japonesa, as concentrações de imunoglobulinas apresentaram picos após três a quatro semanas de imunização.

O aumento das imunoglobulinas após imunização e administração de levamisol decorre da ação do imunoestimulante sobre a proliferação de células de defesa, principalmente linfócitos T (Renoux, 1980), uma vez que este tipo celular é fundamental na produção de anticorpos pelo sistema imune mediado por células. Os anticorpos produzidos podem estar presentes no soro e fluídos corpóreos (Ellis, 2001), muco, ovos (Solem, 2006) e no trato gastrointestinal (Peleteiro e Richards, 1985; Davidson et al., 1993; Rombout e Joosten, 1998) e irão atuar evitando a adesão de bactérias na superfície celular (antiadesinas) (Ellis, 2001), neutralizando toxinas produzidas por diversas bactérias (antitoxinas) (Gudmundsdottir e Magnadottir, 1997) e impedindo que bactérias penetrem em células não fagocíticas, que possuem menos componentes de defesa (antinvasinas) (Magarinos et al., 1996b).

Por outro lado, efeito do levamisol em pacus imunizados com hemácias de coelho, não promoveu aumento do título de anticorpos hemaglutinantes. O resultado contraditório das respostas de produção de anticorpos frente ao estímulo pode ser devido ao tamanho ou idade dos peixes avaliados (Kobayashi et al., 1982; Klesius, 1990; Magnadottir et al., 1999a; Picchietti et al., 2001), condições ambientais (Olesen e Vestergard-Jørgensen, 1986; Klesius, 1990; Magnadottir et al., 1999b), ou estado de saúde (Magnadottir e Guomundsdottir, 1992; Magnadottir et al., 1995; Nielsen, 1999).

A atividade bactericida do soro de peixes ocorre devido à presença de proteínas líticas com capacidade de destruir bactérias (Alexander e Ingram, 1992), consequentemente melhoram a taxa de sobrevivência (Misra et al., 2006). Os peixes alimentados com 500 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol na ração apresentaram a maior atividade bactericida do soro antes e após a inoculação bacteriana, quando comparado com os demais grupos, indicando uma possível ação imunomoduladora do levamisol em pacus. A administração de levamisol em diversas espécies de peixes trouxe efeitos benéficos para o sistema imune, com aumento das concentrações de proteínas séricas responsáveis pela defesa inata contra invasores, aumentando principalmente quando



administrado conjuntamente com imunização, a exemplo do registrado para truta arco íris por Jeney e Anderson (1993).

A administração do levamisol ou a imunização não influenciaram a concentração e a atividade da lisozima que não diferiram do controle. Resultados semelhantes foram descritos por Kumari e Sahoo (2006) para *Clarias batrachus* alimentados com 50, 150 e 450 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol por 10 dias. A lisozima está presente no muco, ovos, sangue e tecidos onde existem leucócitos, principalmente monócitos e neutrófilos (Murray e Fletcher, 1976), e atua sobre a parede de bactérias gram-positivas e negativas causando sua destruição (Magnadotir, 2006).

A atividade respiratória de leucócitos reflete a capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio que irão atuar sobre membranas e destruir agentes invasores (Sharp e Secombes 1996; Ispir e Dorucu 2005; Bashera-John et al., 2002). No presente trabalho, o levamisol e a inoculação de *A. hydrophila* não influenciaram a produção destes compostos, embora a administração de levamisol tenha sido benéfica para *Cyprinus carpio* e *Clarias batrachus* promovendo aumento da atividade respiratória de leucócitos (Rairakhwada et al., 2007; Kumari e Sahoo, 2006).

O levamisol e a inoculação com agente bacteriano não afetaram as concentrações de proteínas séricas analisadas. Este imunoestimulante e a imunização podem influenciar a produção de proteínas séricas líticas e a produção de anticorpos, respectivamente, o que pode aumentar as concentrações de proteínas totais dosadas (Cuesta et al., 2002). Singh et al. (2010) observaram aumento nas concentrações de proteínas totais, globulinas e índice A:G em *Cyprinus carpio*. Do mesmo modo, a administração por 57 e 70 dias do imunoestimulante promoveu efeitos favoráveis nos valores de proteínas totais e globulina em *Cyprinus carpio* (Maqsood et al., 2009). Em relação a albumina, a mais abundante das proteínas séricas, neste trabalho não houve alterações em sua concentração. O mesmo resultado foi observado por Rairakhwada et al. (2007) em *Cyprinus carpio*. Por outro lado, Misra et al., (2009) observaram em *Labeo rohita* alimentadas por 56 dias com levamisol aumento das concentrações de albumina, bem como Maqsood et al. (2009) em *Cyprinus carpio* alimentados por 70 dias com o imunoestimulante. O tempo de administração do imunoestimulante pode ser um fator a

ser considerado, uma vez que diversos estudos com protocolos mais longos apresentaram efeitos benéficos mais evidentes. A albumina e as porções alfa, beta e gama globulinas compõem as proteínas totais séricas que são responsáveis por manutenção da homeostase dos fluídos corpóreos (Schell e Blumberg, 1977). O descobrimento das diferentes classes de proteínas no soro se deu no experimento clássico de Tiselius e Kabat (1939) no qual o soro sanguíneo foi submetido à eletroforese e este se apresentou dividido em quatro picos, que correspondem à albumina, em maior concentração, e as demais globulinas. Dentre as globulinas, estão as imunoglobulinas ou anticorpos, produzidos contra antígeno específico (Goldsby et al., 2002; Maqsood et al., 2009). A dosagem das proteínas totais e da albumina sérica e consequente cálculo das concentrações de globulinas e o índice A:G avaliam importantes variáveis para o sistema imune de peixes.

A avaliação de células sanguíneas é um parâmetro importante para determinação do estado fisiológico e imunológico de peixes (Stoskopf, 1993). O sangue de peixes é composto por eritrócitos e células de defesa, entre as últimas estão os trombócitos e leucócitos que atuam na defesa do organismo contra microrganismos invasores (Secombes, 1996). As células sanguíneas são produzidas pelo tecido linfóide, tais como rim, timo, baço e tecidos linfóides associados à mucosa (Barreda e Belosevic, 2001). Contudo, há escassos estudos avaliando estes parâmetros nas diversas espécies (Cuesta et al., 2002, 2004; Li et al., 2006a; Sado et al., 2010).

O hematócrito, números de eritrócitos, hemoglobina e volume corpuscular médio foram avaliados nos peixes alimentados com levamisol por sete dias, inoculados com *A. hydrophila* e PBS. A inoculação bacteriana e a administração de 125 mg kg<sup>-1</sup> de levamisol promoveram aumento do hematócrito e número de eritrócitos nos pacus tratados. O levamisol atua sobre o hematócrito promovendo proliferação principalmente de linfócitos T (Renoux, 1980). Já a presença de bactérias promove aumento de células imuno competentes, o que pode levar ao aumento do hematócrito e, consequentemente, a atividade respiratória e proteínas líticas produzidas por estas células (Soltani e Kalbassi, 2001).

Os parâmetros hematológicos avaliados refletem o estado fisiológico dos peixes, que podem variar com idade, sexo, época do ano e condição de saúde (Ranzani-Paiva, 2004; Post, 1987). Avaliam também a capacidade do organismo de fornecer energia frente aos manejos impostos pelo sistema intensivo de produção (Carneiro, 2001; Urbinati e Carneiro, 2004). Os valores de hemoglobina e VCM não se alteraram significativamente, permanecendo constante mesmo após a inoculação do agente infeccioso, indicando uma resposta positiva sob influência do imunoestimulante.

A imunização associada à administração do levamisol melhorou a contagem de trombócitos e leucócitos totais, que são células que atuam na defesa do organismo. Estudos indicam que o aumento das células imuno competentes pode promover aumento da fagocitose de agentes invasores e consequente produção de anticorpos (Tempero et al., 1995). O mesmo resultado foi encontrado por Singh et al. (2010) em *Cyprinus carpio* alimentadas com 250 mg kg<sup>-1</sup> e desafiadas com *A. hydrophila*. Resultado semelhante foi demonstrado por Khoshbavar-Rostami et al. (2007), que observaram aumento de células imuno competentes após inoculação de *A. hydrophila* em *Huso huso*. Contudo, a imunização e administração do levamisol não influenciaram os valores de eritroblastos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e célula granulocítica especial. Os valores apresentados pelos peixes nos diversos tratamentos indicam uma resposta contraditória do organismo frente ao imunoestimulante e a imunização. Também Sado et al. (2010) observaram variações conflitantes nas contagens das células de defesa de pacus após administração de levamisol por 15 dias, tais como diminuições nos valores de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e célula granulocítica, além de observarem toxicidade do tecido linfóide após administrações prolongadas. A eficiência da imunomodulação pode estar relacionada com período, doses e via de administração, além da idade, estado imune e variações interespecíficas dos peixes (Mulero, 1998).

O número de leucócitos circulantes é importante para avaliar a produção de lisozima e EROs, principalmente devido aos neutrófilos e monócitos. Estas células não se apresentaram diferentes do controle e assim, os resultados de produção de enzimas líticas não apresentaram diferenças significativas.

A imunização de pacus e administração de levamisol por sete dias promoveu benefícios em parâmetros imunes e hematológicos, promovendo aumento significativo dos títulos de anticorpos. A modulação do sistema imune através do uso de imunização e imunoestimulante é uma alternativa ao uso de antibióticos, assim mais estudos enfocando outros protocolos devem ser executados na tentativa de explorar os efeitos do levamisol na imunidade inata desta espécie de grande interesse econômico.

## 5. Conclusões

A administração de levamisol por sete dias (125 e 250 mg kg<sup>-1</sup>) e a imunização de pacus promoveram aumento no título de anticorpos contra *A. hydrophila*, além de melhorar alguns parâmetros inatos de defesa. Entretanto outros protocolos devem ser estudados para avaliar o efeito do levamisol sobre o sistema imune inato e adquirido de pacus.

## 6. Referências Bibliográficas

ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J.; URBINATI, E.C. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles fed diets containing different protein, lipid, and carbohydrate levels. **Aquaculture Research**, v38, p.36-44. 2007.

ABIMORAD, E.G.; FAVERO, G.F.; CASTELLANI, D.; GARCIA, F.; CARNEIRO, D.J. Dietary supplementation of lysine and/or methionine on performance, nitrogen retention and excretion in pacu *Piaractus mesopotamicus* reared in cages. **Aquaculture**, v.295, p.266–270. 2009.

ALY, S.M.; AHMED, Y.A.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, p.128-136. 2008.

ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Shariff, M.; Arthur, J.R.; Subasinghe, R.P. (Ed.) **Diseases in Asian Aquaculture II**. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p.185-202. 1995.

BARREDA, D.R.; BELOSEVIC, M. Development of macrophages of cyprinid fish **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, p.411–429. 2009.

BASHEERA JOHN, M.; CHANDRAN, M.R.; ARUNA, B.V.; ANBARASU, K. Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major carps immunised with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.12, p.201-207. 2002.

BAYNE, C.J; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p.725-743. 2001.

BECHARA, JA.; ROUX, JP.; DIAS, FJR.; QUINTANA, CIF.; MEABE, CAL. The effect of dietary protein level on pond water quality and feed utilization efficiency of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Aquaculture Research**, v.36, p. 546-553. 2005.

BERGEY, D.H.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore, Maryland, USA: Copyright, 350p. 1994.

CARNEIRO, P.C.F. **Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológicas do matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae)**. 145f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2001.

CHEN, M.F.; LIGHT, T.S. Specificity of the channel catfish antibody to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.6, p.226– 270. 1994.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Levamisole is a potent enhancer of gilthead sea bream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.89, p.169–174. 2002

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Total serum immunoglobulin M are affected by immunomodulators in sea bream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.203–210. 2004.

DAVIDSON, G.A.; ELLIS, A. E.; Secombes, C.J. Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Developmental and Comparative Immunology**, v.17, p.373–376. 1993.

ELLIS, A.E. Innate host defense mechanism of fish against virus and bacteria. **Development and Comparative Immunology**, v.25, p.827-839. 2001.

FINDLAY, V.L.; MUNDAY, B.L. The immunomodulatory effects of levamisole on the non-specific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Disease**, v.23, p.369–378. 2000.

FINDLAY, V.L.; ZILBERG, D.; MUNDAY, B.L. Evaluation of levamisole as a treatment for amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Disease**, v.23, p.193–198. 2000.

GEETS, A.; LIEWES, E.W.; OLLEVIER, F. Efficacy of some antihelminthics against the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. **Disease of Aquatic Organism**, v.13, p.123–128. 1992.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A.; KUBY, J. *In: Immunology*, 5 edição. W.H. Freeman e Company Publisher. 2002.

GUDEMUNDSDOTTIR, B.; MAGNADOTTIR, B. Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes*. **Fish e Shellfish Immunology**, v.7, p.55–69. 1997.

HUNG, H.W.; LO, C.F.; TSENG, C.C.; KOU, G.H. Antibody production in Japanese eels (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel). **Journal of Fish Disease**, v.20, p.195–200. 1997.

ISPIR, U.; DORUCU, M. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v.29, p.1169–1176. 2005.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. **Fish and Shellfish Immunology**, v.3, p.51–58. 1993.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. 2003. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v.221, no. 2, p. 277–287. 2003.

KAJITA, Y.; SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASH, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology**, v.25, p.93–98. 1990.

KHOSHBAVAR-ROSTAMI, H.A.M.; SOLTANI, M.; HASSAN, H.M.D. Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. **Journal of Fish Biology**, v.70, p.1931–1938. 2007.

KLEIN, J.; SATO, A.; NIKOLAIDIS, N.M.H.C. TSP and origin of species: from immunogenetics to evolutionary genetics. **Annual Rev. Genetic**, v.41, p.281-304. 2007.

KLESIUS, P.H. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in Channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.24, p.187-195. 1990.

KOBAYASHI, K.; HARA, A.; TAKANO, A.; HIRAI, H. Study of subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). **Molecular Immunology**, v.19, p.95-103. 1982.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Dietary  $\beta$ -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus*. **Journal of Fish Disease**, v.29, p.95-101. 2006.

LEANO, E.M.; GUO, J.; CHANG, S., LIAO, I.C. Levamisole enhances non-specific immune response of cobia (*Rachycentron canadum*) fingerlings. **Journal of Fish Society of Taiwan**, v.30, p.321-330. 2003.

LI, P.; WANG, X.; GATLIN III, D.M. Evaluation of levamisole as a feed additive for growth and health management of hybrid striped bass (*Morone chrysops*×*Morone saxatilis*). **Aquaculture**, v.251, p. 201-209. 2006.

MAGARINOS, B.; ROMALDE, J.L.; NOYA, M.; BARJA, J.L. E TORANZO, A.E. Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. **FEMS Microbiology Letters**, v.138, p.29–34. 1996b

MAGNADOTTIR, B.; GUOMUNDSDOTTIR, B.K. A comparison of total and specific immunoglobulin levels in healthy Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in salmon naturally infected with *Aeromonas salmonicida* ssp. achromogenes. **Veterinary and Immunology Immunopathology**, v.32, p.179–189. 1992.

MAGNADOTTIR, B.; GUOMUNDSDOTTIR, S.; GUOMUNDSDOTTIR, B.K. Study of the humoral response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), naturally infected with *Aeromonas salmonicida* ssp. achromogenes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.49, p.127-142. 1995.

MAGNADOTTIR, B.; JONSDOTTIR, H.; HELGASON, S.; BJORNSSON, B.; JØRGENSEN, T.Ø.; PILSTROM, L. Humoral immune parameters of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). I. The effects of environmental temperature. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.122, p.173-180. 1999b.

MAGNADOTTIR, B.; JONSDOTTIR, H.; HELGASON, S.; BJORNSSON, B.; JØRGENSEN, T.Ø.; PILSTROM, L. Humoral immune parameters of Atlantic cod (*Gadus*

*morhua* L.). II. The effects of size and gender under different environmental conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.122B, p.181-188. 1999a.

MAQSOOD, S.; SAMOON, M.H.; SINGH, P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.9, p.111-120. 2009.

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, v.255, p.82-94. 2006

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. Immune response, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings fed with levamisole supplemented diets for longer duration. **Aquaculture Nutrition**, v.15, p.356-365. 2009.

MULERO, V.; ESTEBAN, M.A.; MUNOZ, J; MESEGUER, J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.8, p.49-62. 1998.

MUNDAY, B.L.; ZILBERG, D. Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. **Bull. Eur. Assoc. Fish Pathology**, v.23, p.3-6. 2003.

NIELSEN, M.E. An enhanced humoral immune response against the swimbladder nematode (*Anguillicola crassus*), in the Japanese eel (*Anguilla japonica*), compared with the European eel (*A. anguilla*). **Journal of Helminthology**, v.73, p.227-232. 1999.

OLESEN, N.J.; VESTERGARD-JØRGENSEN, P.E. Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout *Salmo gairdneri* under various environmental conditions. **Disease of Aquatic Organism**, v.1, p.183-189. 1986.

OLIVEIRA, A.M.B.M.S.; CONTE, L.; POSSEBON, J.E. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt; **Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática**, p.217-238. 2004.

PAULSEN, S. M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. *In vivo* effects of  $\beta$ -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.14, p.39-54. 2003.

PELETEIRO, M.C.; RICHARDS, R.H. Identification of lymphocytes in the epidermis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Diseases**, v.8, p.161-172. 1985.



PLUMB, J.A.; AREECHON, N. Effect of malathion on humoral immune response of channel catfish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.14, p.355-358. 1990.

POST, G. **Fish Health**. T.F.H. Publications. p.37-41. 1987.

QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C.; SCORVO FILHO, J.D.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.C.; BERNARDINO, G. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture Magazine**, v.36, p.45-50, 2005.

RAIRAKHWADA, D.A.K.; PAL, Z.P.; BHATHENA, N.P.; SAHU, A.; MUKHERJEE, S.C. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v.22, p.477-486. 2007.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Hematologia de peixes. In: SANTOS, H.S.L. (Ed.) **Histologia de peixes**. Jaboticabal, FCVA-UNESP, 1991. p.65-70.

RAO, Y.V.; DAS, B.K.; JYOTYRMAYEE, P.; CHAKRABARTI, R. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.20, p.263-273. 2006.

RENOUX, G., 1980. **The general immunopharmacology of levamisole**. Drugs 19, p.89–99.

ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H.M. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (*Colossoma mitrei* Berg 1895), induced to spawn. **Aquaculture**, v.86, p.105-110. 1990.

ROMANO, L.A.; MEJÍA, J. Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. **Revista Acuática**, v.18. 2003.

ROMBOUT, J.H.W.M.; LAMERS, C.H.J.; HELFRICH, M.H.; DEKKER, A.; TAVERNE-THIELE, J.J. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. **Cell Tissue Research**, v.239, p.519-30. 1985.

SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.41, p.66-75. 2010.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon Edwardsiella tarda vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.12, p.1-16. 2002.

SAHOO, P.K.; KUMARI, J.; MISHRA, B.K. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 21, p. 151–155. 2005.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. *In*: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p.95-103.

SHARP, G.J.E; SECOMBES C.J. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. **Fish and Shellfish Immunology**, v.3, p.119-129. 1993.

SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E. The determination of lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v.58, p.731-736. 1949.

SOLEM, S.T.; STENVIK J. Antibody repertoire development in teleosts—a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. **Developmental and Comparative Immunology**, v.30, p.57-76 .2006.

SOLTANI, M.; KALBASSI, M. R. Protection of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling against *Aeromonas hydrophila* septicaemia using three different antigens. **Bulletin of European Association of Fish Pathologists**, v.21, p.235-239. 2001.

SOUZA, V.L.; OLIVEIRA, E.G.; URBINATI, E.C. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v.5, p.371-379. 2000.

STOSKOPF, M.K. **Clinical Pathology**. *In*: Stoskopf, M.K. (Ed.), Fish Medicine. Saunders, Philadelphia, p. 113–131. 1993.

TAKAHASHI, L.S.; BALDAN, A.P.; URBINATI, E.C. Growth performance and energetic metabolism of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed diets supplemented with ammonium metavanadate. **Aquaculture Research**, v.37, n.13, p.1372-1377. 2006

TEMPERO, M.A.; HAGA, Y.; SIVINSKI, C.; BIRT, D.; KLASSEN, L.; THIELE, G. Immunologic effects of levamisole in mice and humans: evidence for augmented antibody response without modulation of cellular cytotoxicity. **Journal of Immunotherapy**, v.17, p.47-57. 1995.

TISELIUS, A.; KABAT, E.A. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparation. **The Journal of Experimental Medicine**, v.69, p.119-131.1939.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. *In*: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI,

N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt; Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. p.171-194.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D.; TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2ª edição, 2010. p.225-246.

VANDEPITTE, J.; ENGBAEK, K.; PIOT, P. **Métodos básicos de laboratório em bacteriologia clínica**. Genebra: Organização Mundial de Saúde, 1993. 122p.

VIEIRA, R.H.S.F. Microbiologia, higiene e qualidade do Pescado. São Paulo: Livraria Varela, p.380. 2003.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marked fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.165-168. 2002.

WON, K.M.; KIM S.M.; PARK, S.I. The effects of b-1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. **Journal of Fish Pathology**, v.17, p.29-38. 2004.

YILDIRIM, M.; LIM, C.; WAN, P.J.; KLESIUS, P.H. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol–acetic acid. **Aquaculture**, v.219, p.751-768. 2003.